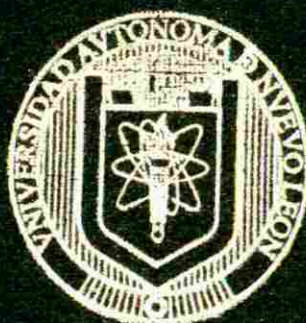


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**"DETECCION SEROLOGICA Y MOLECULAR
DEL VIRUS DE LA LEUCOSIS BOVINA (VLB)
EN EL NORESTE DE MEXICO"**

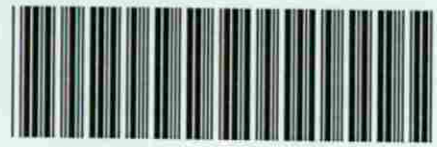
**POR
RAMIRO AVALOS RAMIREZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO ACADEMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

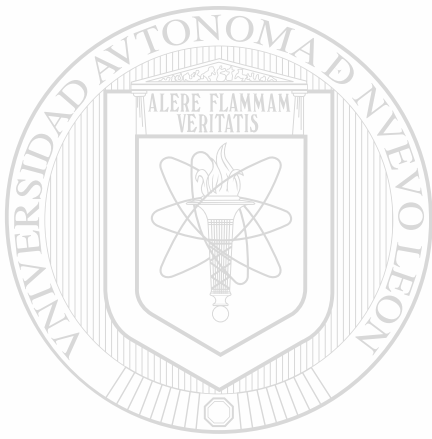
DICIEMBRE 1995.



M
1967
14
3



1080072494



UANL

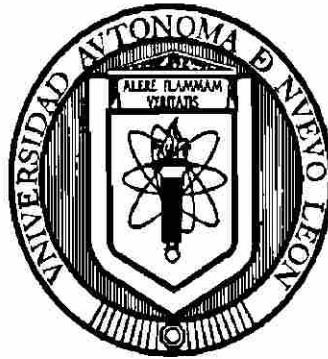
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**" DETECCIÓN SEROLÓGICA Y MOLECULAR DEL VIRUS DE LA
LEUCOSIS BOVINA (VLB) EN EL NORESTE DE MEXICO "**

Por

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

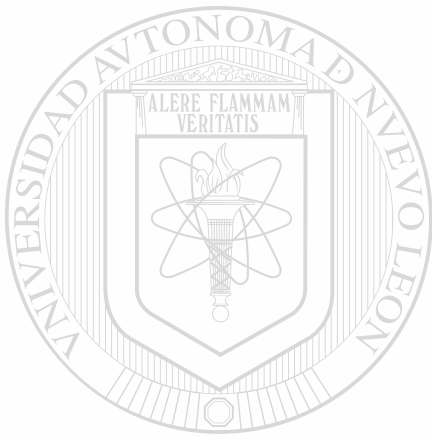
RAMIRO AVALOS RAMIREZ
Medico Veterinario Zootecnista
Universidad Autónoma de Nuevo León
Monterrey, Nuevo León

1987

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS
con Especialidad en Microbiología**

Diciembre 1995

TM
SF967
.L4
R3

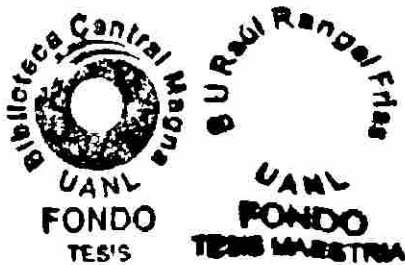


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

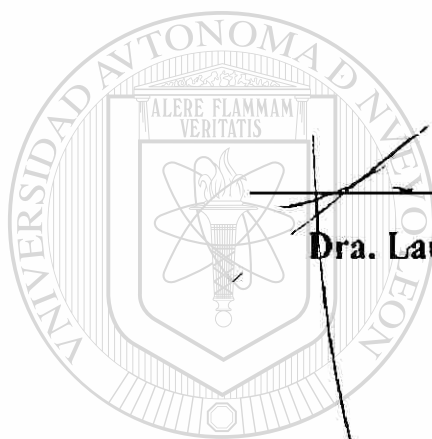
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**“ DETECCIÓN SEROLOGICA Y MOLECULAR DEL VIRUS DE LA
LEUCOSIS BOVINA (VLB) EN EL NORESTE DE MEXICO”**

Comision de tesis :





Dra. Laura Trejo Ávila (Director)



Dr. Reyes Tamez Guerra (Asesor)



Dr. José Antonio Salinas Meléndez (Asesor)



MC. Pablo Zapata Benavidez (Asesor)

DEDICATORIAS

Al creador del Universo quien empleó hasta el más mínimo detalle en el diseño y ejecución de su obra. Gracias por permitirme conocer “algo” de todo lo bello creado en este breve lapso de tiempo de mi vida.

A mis padres , Román Avalos Juárez y Julia Ramírez Gutierrez por su ejemplo, entusiasmo y fortaleza para cuidarme, enseñarme y comprenderme.

A mis hermanos, Concepción, Rosa, Rosario, Guillermo y Román, quienes me brindaron y soportaron algunos años de su vida.

A mi Esposa Trinidad y mi hija Julia Valeria y a la bebe que viene , porque su presencia y alegría me alienta a continuar (Disculpenme por no estar todo el tiempo que quisiera estar con ustedes).

Con mucho cariño ha ti (donde quiera que estes), que me has brindado cosas buenas de esta vida.

A todas las personas que me hicieron pasar ratos felices, amargos y de otra índole, dado que ello me permitio conocerlos

AGRADECIMIENTOS

Creo que no serian suficientes estas hojas para externar mis agradecimientos a todas las Personas e Instituciones que de una manera u otra han influido en el desarrollo personal y académico de un servidor.

A la Universidad Autonoma de Nuevo León que a pesar de lo que se diga de ella siempre alienta la flama de la verdad.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia cuya evolución a sido muy favorable para la formación de buenos profesionales.

A la Facultad de Ciencias Biológicas escuela que ha sabido proyectar el quehacer en las Ciencias Biológicas.

A mis asesores : Dra. Laura Trejo Avila, Dr. Reyes Tamez Guerra, Dr. José Antonio Salinas Melendez y MC. Pablo Zapata Benavides

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Al personal de la FMVZ de la UANL quienes siempre me han brindado un apoyo y trato especial.

Dr. Rafael Ramírez, Dr. José A. Salinas, MVZ. MC. Javier Omar Sanchez Guerra, MVZ. MC. Telesforo Vera, MVZ. MC. Alfredo Wong, MVZ. M.C. Juan J. Zárate, MVZ. EPG Mario A. Guzmán, MVZ. EPG. Martha V. Garza, MVZ. Guillermo Dávalos Aranda, MVZ. MC. Fco. Javier Picón Rubio, MVZ. Marco A. Cantú, QCB. Lourdes Silva, QBP. A. Aguirre, Dr. Daniel K. Miller. Dr. Roque G. Ramírez, Dr. Jorge R. Kawas, Biol. Jaime Hernandez, MVZ. Alicia Nevarez Garza, MVZ. EBPC. Jorge

Martínez, MVZ. Sergio Ramiro Temblador, MVZ. EA. Francisco Santoyo Stephano y con afecto al Dr. Rubén Cervantes Vega.

A todas las secretarias en especial para la Srita. Maribel Robledo Cubillos, Sra. Maria de la Cruz Padilla Dávila y Sra. Irma González González.

A los Estudiantes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL. Especialmente a quienes tuve la fortuna de impartirles clases y a los que han sido ayudantes del Laboratorio Central de Diagnóstico Veterinario.

Al personal del Laboratorio de Inmunología y Virología del departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, quienes siempre me dieron un trato cordial y amable.

Dr. Reyes Tamez, Dra. Cristina Rodriguez, MC. Juan M. Alcocer, Mati, Leonardo, José Luis Mendez, Bertha, Catarino, Araceli, MC. Juan Fco. Contreras, QBP Arturo Chavez R. Especialmente para la QBP. M. Antonieta Lara Rodriguez y MVZ.MC. Pablo Zapata Benavides, quien a este último le corresponde grán parte de este trabajo.

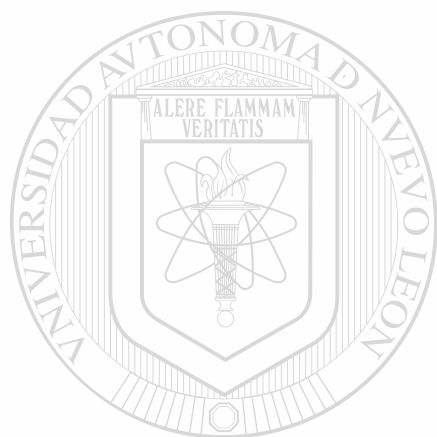
A los propietarios de todos los hatos en los cuales se nos permitió obtener y analizar muestras (Especialmente al personal de la Unidad de Producción el “Canada” perteneciente a la Facultad de Agronomía de la UANL y al Dr. Juan Villarreal, al Director de esa Institución) y todas aquellas personas que me auxiliaron en esta tarea.

INDICE GENERAL

	Página
INDICE DE CUADROS	IX
INDICE DE FIGURAS	XI
ABREVIATURAS.....	XIII
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	4
2.1. Objetivos	5
2.2. Hipótesis	6
3. ANTECEDENTES	7
3.1. Historia del Linfosarcoma / VLB en bovinos	7
3.2. Genética, Morfología y Análisis Físicoquímico	9
3.3. Manifestaciones clínicas en bovinos positivos a VLB	14
3.4. Epizootiología.....	16
3.5. Diagnóstico Serológico de la Infección por VLB	19
3.6. Detección del provirus del VLB	21
3.7. Importancia económica	23
4. MATERIAL Y METODOS	26
4.1. Ubicación de las zonas muestreadas.....	26
4.2. Toma de muestras, separación de suero y mononucleares sanguíneos periféricos (MSP)	26
4.3. Cultivo de células y obtención de antígenos.....	27
4.3.1. Cultivo de Mononucleares sanguíneos periféricos (MSP) y obtención de antígenos en sobrenadante celular (ASC)	27
4.3.2. Cultivo de células de riñón de cordero persistentemente infectadas con VLB (FLK-VLB) y producción de antígenos solubles.....	28
4.3.2.1. Purificación de la Glicoproteína 51 (Gp 51) del VLB	28

4.4. Detección de anticuerpos contra el Virus de la Leucosis Bovina.	29
4.4.1. Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG).	29
4.4.2. Ensayo Inmunológico Ligado a Enzima (ELISA)	30
4.4.2.1 Curva de referencia y establecimiento del punto de corte en ELISA	32
4.4.3. Inmunoelectrotransferencia (WB)	33
4.5. Detección de antígenos del Virus de la Leucosis Bovina.	34
4.5.1. Fijación de Complemento	34
4.5.2. Inmunoelectrotransferencia (WB).	35
4.6. Detección del provirus del VLB.	37
4.6.1. Amplificación y purificación del plásmido pGEM3-Tax-Rex-X-VLB.	37
4.6.2. Extracción de DNA de MSP cultivados.	39
4.6.3. Dot Blot	40
4.7. Microscopía electrónica de linfocitos cultivados de vacas seropositivas al VLB.	42
4.8. Obtención de datos y análisis estadístico	43
4.9. Diagrama de flujo	44
5. RESULTADOS	45
5.1. Total de muestras, tipo de producción y procedencia.	45
5.1.1. Edad y razas de los animales	45
5.2. Seropositividad y prevalencia.	45
5.3. Comparación entre ELISA, WB e IDAG para detectar anticuerpos contra VLB en hatos con diferente seroprevalencia.	49
5.4. Detección de antígenos del VLB en cultivos de MSP	50
5.5. Comparación entre Westernblot y FC para la detección de antígenos del VLB en cultivos de MSP	51

5.6. Detección del provirus del VLB en DNA de MSP cultivados y comparación con las pruebas serológicas para detectar al VLB.	52
5.7. Detección de viriones del VLB.	54
6. DISCUSION	55
7. CONCLUSIONES	64
8. LITERATURA CITADA	65
9. APENDICE	79



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

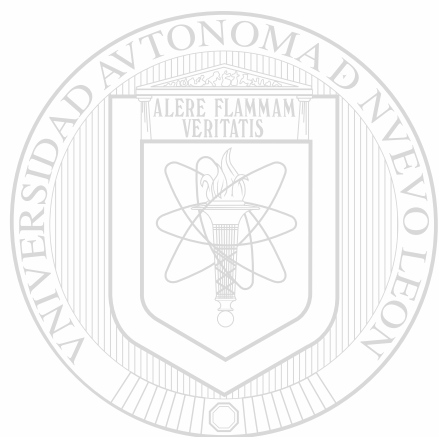


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
I	Localización, tipo de producción y seropositividad de los hatos muestreados en el Noreste de México para detectar el Virus de la Leucosis Bovina	46
II	Seropositividad contra el Virus de la Leucosis Bovina en bovinos del Noreste de México, de acuerdo a la función zootécnica	47
III	Seropositividad contra el VLB en bovinos de diferentes edades de algunos hatos lecheros del noreste de México.	47
IV	Distribución de bovinos seropositivos al Virus de la Leucosis Bovina de acuerdo a la raza y función zootécnica	48
V	Comparación entre ELISA, WB e IDAG para detectar anticuerpos séricos contra VLB en tres hatos de bovinos con diferentes seroprevalencias.	49
VI	Densidad óptica obtenida en la prueba de fijación de complemento para la detección de antígenos del VLB en cultivo de MSP de vacas positivas a IDAG	50
VII	Comparación entre WB y Fijación de complemento para la detección de antígenos del VLB en linfocitos de vacas positivas ó negativas a IDAG	52

VIII Comparación entre ELISA, Dot blot é IDAG para detectar al VLB
en un hato lechero con elevada seroprevalencia. 54



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



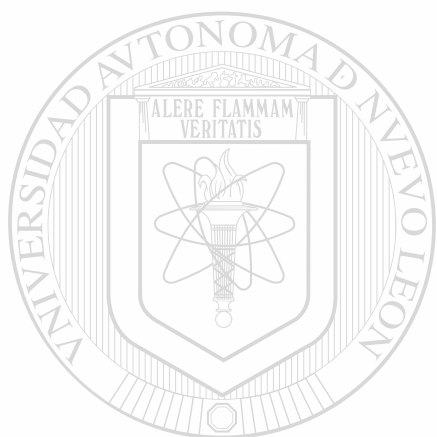
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Distribución relativa de las zonas muestreadas en el noreste de México para detectar anticuerpos contra el Virus de la Leucosis Bovina (VLB) en suero de bovinos.	26
2. Patrón utilizado en la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel . . .	30
3. Esquema de distribución de los sueros sospechosos y controles negativos y/o positivos al virus de la Leucosis Bovina en la microplaca de ELISA.	31
4. Curva de referencia y punto de corte obtenida con los sueros controles en la prueba de ELISA.	32
5. Reactividad obtenida en la Inmunoelectrotransferencia con el suero de vacas seropositivas y seronegativas (IDAG) contra las proteínas estructurales Gp51 y P24 del VLB	34
6. Serorreactividad obtenida contra Gp51, P24 y otras proteínas del sobrenadante de cultivo de linfocitos de vacas seropositivas o negativas a VLB	36

7. Mapa genético del plásmido pGEM3-Tax-Rex-X-VLB, empleado para detectar el genoma proviral del VLB en linfocitos cultivados de bovinos.	37
8. Corrimiento electroforético del plásmido pGEM3-Tax-Rex-X-BLV.	39
9. Corrimiento electroforético del DNA de mononucleares bovinos . . .	40
10. Absorbancia obtenida con el sobrenadante de cultivo de linfocitos en la prueba de fijación de complemento.	51
11. Reactividad obtenida en la membrana de nitrocelulosa con el DNA de MSP cultivados para detectar al provirus del VLB en vacas seropositivas o seronegativas a IDAG.	53
12. Partículas virales tipo "C" observadas en mononucleares sanguíneos periféricos estimulados con Concanavalina A, obtenidos a partir de vacas seropositivas al VLB.	54

P24	Proteína de 24 Kd del Virus de la Leucosis Bovina
PSA	Portador Sano Asintomático
pX_{BL}	Gen pX del Virus de la Leucosis Bovina
RNA	Acido Ribonucleico
SSC	Solución Salina de Citratos
VLB	Virus de la Leucosis Bovina
WB	Inmunoelectrotransferencia



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ASC	Antígenos en Sobrenadante Celular
BpL	Bovinos destinados a la producción de leche
BpC	Bovinos destinados a la producción de carne
°C	grados Celsius
DNA	Acido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo Inmunológico Ligado a Enzima
EUA	Estados Unidos de América
FC	Fijación de Complemento
Gp51	Glicoproteína de 51Kd del Virus de la Leucosis Bovina
h	horas
IDAG	InmunoDifusión en Agar Gel
lbs	libras de presión
LEB	Linfosarcoma Enzoótico Bovino
LP	Linfocitosis Persistente
LTR	Terminaciones Largamente Repetidas
μl	microlitros
μg	microgramos
ml	mililitros
MSP	Mononucleares Sanguíneos Periféricos
m	minutos
ORF	Marco de Lectura Abierta
PBS	Buffer de Fosfatos Salino
PM	Peso Molecular

1. RESUMEN

La importancia de las infecciones retrovirales en los últimos años ha aumentado considerablemente tanto en la medicina humana como en la veterinaria. Los retrovirus poseen la capacidad de integrarse y permanecer en el ADN de las células que infectan, de tal forma que el individuo que adquiere la infección permanece así durante toda su vida. El Virus de la Leucosis Bovina (VLB), es un retrovirus linfotrópico que infecta en condiciones naturales a los bovinos, en los cuales se le ha asociado con detrimentos en la productividad y sobrevivencia a pesar de que la mayoría de los infectados permanecen asintomáticos y sólo una baja proporción manifiestan sintomatología clínica “maligna” conocida como Linfosarcoma Enzoótico Bovino (LBE). El virus se encuentra distribuido en la población bovina del mundo, sobretodo la destinada a la producción lechera; en México se ha reportado la infección pero no se tienen datos de la frecuencia y distribución. Las pérdidas asociadas a la presencia del VLB en hatos afectados justifican los estudios tendientes a conocer la seroprevalencia de esta infección y en base a estos datos aplicar estrategias de control y erradicación, por lo que el presente estudio se realizó con el fin de conocer la frecuencia serológica del VLB en bovinos del noreste de México, comparar tres métodos serológicos para el diagnóstico de la infección y detectar antígenos y provirus de este retrovirus en animales de hatos seropositivos.

Durante 22 meses (mayo '92-marzo '94) se obtuvieron 2638 sueros, de los cuales 1353 (51.2%) pertenecían a bovinos destinados a la producción lechera (BpL), mientras que 1285 (48.7%) procedían de productores de carne (BpC). Para determinar la seroprevalencia se empleó la prueba de inmunodifusión en agar gel (IDAG) utilizándose el antígeno glicoprotéico (Gp₅₁) del VLB. La seroprevalencia general encontrada fue de 20.8 % (548/2638); sin embargo, acorde con el tipo de producción los BpL resultaron más afectados ($p < 0.05$) con

39.8% (539/1353 que los BpC con 0.7% (9/1285). De los BpL la raza holstein fue la única afectada (41.3%, 539/1305), mientras que de los BpC se encontraron positivos en las razas Beffmaster (3/92, 3.3%), Sta. Gertrudis (2/120, 1.7%) y cruza de Cebú (4/690, 0.6%). De acuerdo a la procedencia, de los 22 municipios estudiados, la seroprevalencia varió desde 0 hasta 65.2% ubicándose la mayoría de los hatos seropositivos (principalmente lecheros) en Pesquería, Marín, Galeana y Escobedo, N.L., además Saltillo y Torreón Coah. De los BpL solamente se analizó un hato de la raza Guersey (en General Cepeda, Coah.) resultando éste el único seronegativo de los hatos de BpL. Una gran proporción de los seropositivos se ubicó en edades de entre 2-4 y 6-8 años pero no fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$)

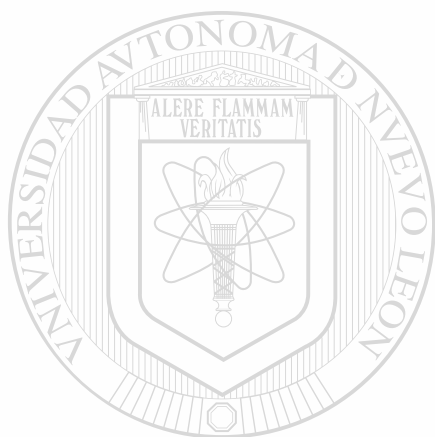
Por otra parte, empleando el mismo antígeno, se estandarizó y comparó los procedimientos de ELISA e Inmunoelectrotransferencia (WB) con la IDAG en sueros previamente recolectados de 3 hatos (2BpL y 1BpC) que habían presentado elevada, baja y nula prevalencia de anticuerpos contra VLB por IDAG. ELISA y WB concordaron en un 95% y resultaron más sensibles que IDAG ($p < 0.05$).

También se detectaron, mediante fijación de complemento, antígenos del VLB en cultivos de linfocitos de vacas seropositivas y seronegativas a IDAG, evidenciándose reacciones (WB) contra diversas proteínas estructurales y precursores proteicos del Virus.

Así mismo, mediante el uso de Dot Blot, se detectó el “provirus” del VLB en linfocitos cultivados de vacas seropositivas y seronegativas al VLB en un hato con elevada seroprevalencia (determinada por IDAG), con lo que se evidenció que IDAG falla para detectar una gran proporción de bovinos positivos al virus.

Los cultivos de Mononucleares Sanguíneos Periféricos (MSP) de dos vacas seropositivas al VLB, analizados con microscopía electrónica de transmisión, presentaron partículas virales similares al tipo “C”.

El monitoreo serológico del presente estudio revela parámetros similares a lo reportado en otros países; sin embargo, dadas las características de las infecciones retrovirales, es necesario no solo realizar estas pruebas serológicas, ELISA, WB e IDAG sino también detectar al provirus y sus antígenos para con ello tener un parámetro más preciso de la distribución del VLB en la población bovina.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2. INTRODUCCION

Los análisis epizootiológicos de las afecciones en los animales domésticos son de gran importancia, puesto que con éstos se pueden determinar la presencia y frecuencia de agentes infecciosos que inciden directa ó indirectamente en la producción pecuaria. Así, con los datos obtenidos de los análisis se pueden establecer medidas para controlarlos y/o erradicarlos.

De los agentes infecciosos, los virus constituyen un grupo, que en virtud de sus características biológicas, tal vez sean más difíciles de prevenir, detectar y erradicar. En este grupo, los retrovirus han atraído considerable atención por su importancia tanto para la medicina humana como veterinaria, el comportamiento en la naturaleza de tales agentes es un tanto complejo, ya que pueden inducir tumores o alteraciones inmunológicas que culminan con infecciones oportunistas en los animales afectados. Estos virus poseen un genoma diploide de RNA con polaridad positiva, además de la enzima transcriptasa reversa, que le permite la integración del ácido nucléico viral en el ácido desoxirribonucleico de la cromatina celular del hospedero; así que al infectar a un organismo, éste permanece con el retrovirus durante toda su vida.

El Virus de la Leucosis Bovina (VLB), es un oncornavirus ubicado en la familia retroviridae y es el causante de la neoplasia más maligna y común de los bovinos, tal enfermedad fue reconocida por primera vez en 1876, sin embargo, no fue hasta en 1969 en que se logró aislar el virus, hecho que marcó la pauta para un mejor conocimiento de la infección y de la interrelación que guarda ésta con la producción bovina, de hecho, la enfermedad se caracteriza por la inducción de tumores clonales, derivados de linfocitos B, después de un gran período latente que avanza progresivamente y conduce a la muerte ó desecho prematuro del animal afectado.

Existen aún controversias acerca de la importancia de la infección por VLB para la producción bovina, especialmente en el ganado lechero que se ha

demostrado como el más afectado; no obstante lo anterior, en Europa se realizan esfuerzos importantes para controlar y/o erradicarla ya que como se ha observado es económicamente muy importante (sobre todo los hatos que mantienen prevalencias de hasta 90%) debido a la pérdida de mercados que solicitan animales libres del VLB, así como a los costos que se realizan para el diagnóstico y tratamiento del linfosarcoma, desecho prematuro o muerte del ganado (especialmente los de registro) y el decomiso de las canales al sacrificio, entre otros.

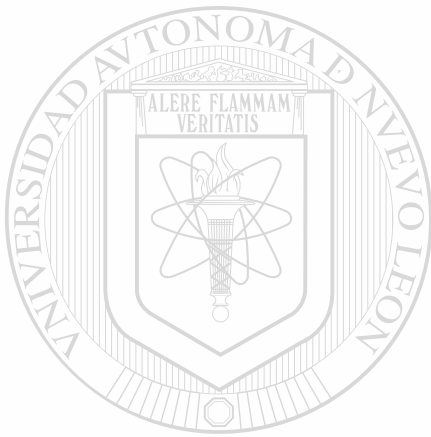
En la actualidad en la zona Noreste de México la epidemiología del VLB no está completamente entendida, por lo que la descripción o el hallazgo de la infección en ciertas poblaciones de bovinos nos proporcionarán información útil; y así, mientras más datos de este tipo se obtengan se podrán implementar métodos para controlar y/o erradicar la enfermedad.

2.1 Objetivos

- A).- Determinar la frecuencia serológica del Virus de la Leucosis Bovina en hatos del noreste de México.
- B).- Correlacionar la positividad con la raza y el tipo de producción.
- C).- Comparar la sensibilidad de los métodos serológicos de ELISA, Inmunoelectrotransferencia (WB) e IDAG en el diagnóstico de la infección por el Virus de la Leucosis Bovina.
- D).- Detectar antígenos Virus de la Leucosis Bovina en cultivos de linfocitos de vacas seropositivas o seronegativas en IDAG.
- E).- Detectar el provirus en vacas seropositivas y seronegativas.

2.2 Hipótesis

Dadas las características de las infecciones retrovirales, en particular el Virus de la Leucosis Bovina (VLB), es posible que el comportamiento epizootológico de éste virus en el área noreste de México sea similar a lo reportado en otros países, además es factible detectar bovinos seronegativos pero infectados con éste virus (portadores del provirus).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3. ANTECEDENTES

3.1. Historia del Linfosarcoma/VLB en Bovinos.

El Linfosarcoma Enzoótico Bovino (LEB) fue descrito por primera vez en 1817 por Leisering en Alemania, posteriormente otras descripciones las realizaron Siedmagrotzky y Johne en los años 1878 y 1879 respectivamente (1).

A principios de siglo se sugirió la etiología viral del linfosarcoma y leucemia bovina, la cual ocurriría con alta incidencia en hatos de ciertas zonas geográficas (enzoóticamente) y en ciertas familias dentro de las mismas (31,86).

La naturaleza contagiosa asociada al movimiento de bovinos fue demostrada en 1917 por Knuth y cols. (1). Estudios ulteriores de transmisión natural y experimental indicaban que el LEB es ocasionado por un agente infeccioso transmitido por sangre, lo cual, fue posteriormente apoyado por observaciones realizadas en hatos lecheros Suizos en donde ocurrió una alta frecuencia de linfocitosis y leucosis posterior a la vacunación contra babesiosis usando sangre completa de bovino (35,47).

De 1955 a 1963, en Dinamarca, Bendixen encontró una relación entre el Linfosarcoma Enzoótico Bovino y la linfocitosis persistente, y separa éstas de las formas esporádicas de Linfosarcoma (1,36).

Los primeros intentos para controlar el linfosarcoma bovino se llevaron a cabo en Europa del este, particularmente en Dinamarca, en donde se comenzó un programa de erradicación intensivo en 1959 con la examinación de hatos en donde originalmente se reportaron casos de leucosis y hacia 1968 efectuaron un estudio hematológico sistemático en todo el ganado mayor de 2 años, con intervalos de 3 meses, con el propósito de encontrar animales con Linfocitosis Persistente; todos los bovinos de los hatos reportados como infectados fueron enviados al sacrificio sin importar su estatus hematológico individual (107), con

esta estrategia y a la luz de los conocimientos actuales, se llegó a la conclusión que se redujo la prevalencia de leucosis pero no se erradicó (36,107).

En base a las características clínicas patológicas y epidemiológicas, el linfosarcoma en bovinos se clasificó en 4 tipos (66,86)

Linfosarcoma Enzoótico Bovino (LEB) (forma adulta).

Linfosarcoma del Timo (forma tímica).

Linfosarcoma del Becerro (forma juvenil).

Linfosarcoma de la Piel (forma cutánea).

Los últimos tres, aún no se ha demostrado que sean causados por algún agente infeccioso, mientras que para el LEB desde 1969 se conoce que es causado por el Virus de la Leucosis Bovina (VLB), ya que en este año se logró su aislamiento de una vaca linfosarcomatosa en los Estados Unidos de América (68).

Tal hallazgo condujo al desarrollo de técnicas serológicas (10,27,32,33,34,37,40,41,50,70,71,81,109) y moleculares (2,78,80,83,97) para diagnosticar la infección por el VLB y se evidenció que está ampliamente distribuido en la población bovina, principalmente en la destinada a la producción de leche (6,13,25,44,65,92,100,101,115).

En 1974 se demostró que los viriones del VLB contienen actividad de transcriptasa reversa, clasificándose como un oncornavirus de la familia retroviridae (79).

La Comunidad Económica Europea aprobó el uso de la inmunodifusión en agar gel (IDAG), como prueba oficial en los programas de detección de la enfermedad (43,53).

En la Unión Americana al menos 20% de la población lechera adulta posee anticuerpos contra VLB (13,28,44,73), pero dado que se considera que la infección persiste de por vida en el animal (4,12,18), la enfermedad puede llegar a ocasionar fuertes pérdidas económicas al no implementarse programas de control (8,32,42,52,54,92,98,103,111,112).

Los decomisos por Linfosarcoma Enzoótico Bovino (LEB) en los E.U.A. varían de 10 a 15 canales por cada 10,000 animales sacrificados anualmente (104,107), tal número de casos en un tiempo relativamente corto no reflejan la situación real, ya que el porcentaje de animales que desarrollan LEB no es más del 5% y más del 60% del ganado infectado son portadores clínicamente normales (31,36).

En México se reportó la enfermedad en 1967 (4) y al igual como sucede en E.U.A. no todos los casos de LEB son diagnosticados; además, existe un gran número de rastros clandestinos y no es obligación reportar a las autoridades sanitarias el hallazgo de LEB (49).

Serológicamente, el VLB ha sido diagnosticado en ciertas regiones del país fluctuando la prevalencia serológica desde 0% hasta 32% (6,25,57,77,105,115).

A principios de la década de los 80's se descubrió una estrecha relación en la organización genómica, patología y forma de transmisión entre el VLB y el Virus de la leucemia de las células T de humanos (HTLV) (11,12,95).

3.2. Genética, morfología y análisis fisicoquímico.

El Virus de la Leucosis Bovina es un retrovirus exógeno competente con la replicación y recientemente propuesto por Sagata y col. (94), junto con el virus de la Leucemia T de Humanos (HTLV) y el virus de la Leucemia T de simios (STLV), como miembro de un nuevo grupo de oncornavirus designado como: "E".

La secuencia nucleotídica completa del genoma integrado de VLB consta de 8714 nucleotidos y se representa en la forma:

5'LTR-gag-pol-env-pX_{BL}-3'LTR. (94,95).

El Provirus de VLB presenta los genes virales flanqueados por Terminaciones Largamente Repetidas (LTR's, "Long Terminal Repeat"), los cuales se unen covalentemente al ADN celular cuando el provirus se integra en el

genoma del hospedero celular (11,12), están constituidos por las regiones U₃-R-U₅ y poseen 530 pares de bases (94) flanqueados por 6 pares de bases repetidos de DNA celular (20). Estos juegan un papel importante en la replicación, incrementando el volumen basal de RNA mensajero y en la integración del DNA viral, así como en los procesos de transformación celular cuyas acciones son ejercidas por los elementos promotores y "Enhancer's" que incrementan la eficiencia transcripcional de los genes virales y celulares (12,39,113).

El gen gag es el primer marco de lectura abierta (Open reading frame, ORF), está constituido por 1178 pares de bases y se extiende desde el nucleótido 628 hasta el 1806, éste da origen a un precursor de proteínas de 45 kilodaltons, [Pr45gag], con el orden secuencial de NH₂-p₁₅-p₂₄-p₁₂-COOH y comienza con el primer triplete ATG que aparece " río abajo " del 5'LTR (12). Por procesamiento postraduccional da lugar a las proteínas estructurales internas que constituyen el core, las proteínas p₁₅ y p₂₄ de 190 y 215 aminoácidos respectivamente, y a la p₁₂ de 69 aminoácidos que se une al ácido nucleico.

La proteasa del virus de la Leucemia Bovina (BLVPR) (PM 14 Kd) es codificada por un segmento del ARN viral localizado entre el gen gag y el gen pol, sin embargo, el marco de lectura es diferente a estos dos últimos genes, la terminación 5' del ORF del BLV PR se extiende 38 codones "río arriba" del primer codón (NH₂ terminal) de la proteína madura y traslapa el ORF de gag por 7 codones, la terminación 3' del BLV PR se extiende 26 codones "río abajo" del codón de terminación (COOH terminal) de la proteinasa madura y se traslapa 8 codones con el ORF del gen pol, el cual se encuentra ubicado a 509 nucleótidos "río abajo" del gen gag y presenta un traslape de 55 bases con el gen de envoltura (113). El gen pol, que tiene el más grande marco de lectura abierta se extiende desde los nucleótidos 2318 al 4876, codifica para un precursor que da origen a la transcriptasa reversa, este precursor es una poliproteína que contiene

determinantes de los genes de gag y pol, pesa 95 Kd, da origen a la transcriptasa reversa de 70 Kd y a una endonucleasa de 32 kilodaltons (17,38).

El gen env se extiende del nucleotido 428 al 6368 y codifica para 515 aminoácidos que dan origen a dos proteínas glicosiladas de envoltura, la Gp₅₁ y la Gp₃₀ (12,63). La primera es una glicoproteína de superficie de 268 aminoácidos que contiene 8 sitios parcialmente glicosilados y es la más comúnmente utilizada en las pruebas serológicas, mientras que la segunda es una glicoproteína transmembranal de 214 aminoácidos que contiene dos sitios hidrofóbicos y dos secuencias altamente glicosiladas (12,38,79).

El gen Px está localizado entre el gen env y el LTR 3' y contiene 1817 nucleotidos, dentro de esta región están codificados 3 marcos de lectura (ORF= "Open Reading Frame") denominadas X-I, XII, y XIII (20); en células infectadas se ha identificado un ARNm subgenómico que contiene los marcos de lectura abiertas X-I y XII traslapados, este ARNm es generado por un doble proceso de maduración en la cual se unen tres regiones genéticas, la primera es de 100 nucleotidos y está ubicada en la región "R" de la terminación 5' LTR, la segunda un exón de 220 bp inmediato a la terminación 5' del gen env y la última corresponde a 1360 nucleotidos contenidos en la terminación 3' del ARN genómico; la traducción de ARN subgenómico produce las proteínas p₃₈ (proteína Tax), derivada del ORF X-I y p₁₈ (proteína Rex) originada del X-II; ambas son proteínas nucleares no estructurales y tienen un efecto "in trans" sobre las secuencias reguladoras del VLB (63,79). La p₁₈ es una fosfoproteína nuclear que se requiere para la acumulación del RNA viral, actúa post-transcripcionalmente para promover la expresión citoplasmática de RNAm virales que codifican proteínas estructurales y enzimas del VLB (48).

Los viriones del VLB, vistos con el microscopio electrónico, son esféricos con un nucleoide electrodenso y rodeado por una membrana que forma la envoltura externa (15,68,79). El diámetro total varía de 90 a 120 nm, mientras

que la nucleocápside presenta diámetros de 60 a 90 nm. (15,68). Los viriones poseen 2 moléculas idénticas de RNA de cadena sencilla con coeficiente de sedimentación (S) de 60 a 70S, una transcriptasa inversa y proteínas estructurales glicosiladas y no glicosiladas (48); las partículas virales intactas presentan un gradiente de densidad de 1.15-1.18 g/ml.(48,79).

La desnaturalización del ARN 60-70S produce subunidades que contienen poly(A), sedimentan a 38S y migran como un solo componente de 8.8 kb (38).

El DNA no integrado y los provirus del VLB son de 9.4kb (18,39).

De acuerdo al análisis químico de las partículas virales el 60% corresponde a proteína, 35% a lípidos, 2.2% a ácidos nucleicos (entre éstos 0.04% de ADN) y 0.5% a carbohidratos (79).

Mediante análisis electroforéticos en geles de poliacrilamida, estudios de filtración en presencia de hidrocloreuro de guanidina y de inmunoprecipitación se han encontrado en los viriones del VLB poseen seis proteínas, cuatro no glicosiladas (p_{10} , p_{12} , p_{15} y p_{24}) y dos glicosiladas Gp_{30} y Gp_{51} (12,63). Las primeras se encuentran en la parte interna del virión y las últimas están hacia la parte externa insertadas en la membrana viral (12,38).

La p_{24} es la proteína principal del core y fue la primer proteína estructural detectada en el VLB, es un proteína neutra, moderadamente hidrofóbica y químicamente diferente a las proteínas principales del core de otros retrovirus, sin embargo se ha encontrado fuerte homología con la p_{24} del Virus de la Leucemia de las células T de Humanos, esta proteína , también denominada inicialmente como "antígeno éter-resistente" (83), puede extraerse de los viriones con tratamientos con éter, detergentes no iónicos o por congelación-descongelación. Los animales leucémicos infectados natural o experimentalmente producen anticuerpos precipitantes y fijadores de complemento contra esta proteína (33,34).

Los precursores intracelulares de estas proteínas se han detectado por inmunoprecipitación con suero de especificidad definida contra extractos de

células infectadas con BLV con estos métodos se han encontrado dos polipéptidos de peso molecular de 70,000 (Pr₇₀ gag) y 45,000 (Pr₄₅ gag) los cuales son los precursores de la p₂₄, p₁₅, p₁₂ y p₁₀; al parecer tanto la Pr₇₀ y Pr₄₅ son sintetizadas independientemente. (38,39,63).

Las glicoproteínas 51 y 30 (Gp₅₁ y Gp₃₀) se presentan en la envoltura del BLV, la primera es una glicoproteína de superficie, blanco de anticuerpos neutralizantes y de efecto citolítico en células infectadas (9,38), mientras que la última es transmembranal e induce la fusión de membranas (48,79), ambas se encuentran asociadas en relación 1:1 por uniones de disulfuro y se derivan de un mismo precursor de 72,000 daltons (gPr₇₂ env) (38,63).

Se han producido anticuerpos monoclonales contra la Gp₅₁ y por ensayos de competición de unión anticuerpo se ha encontrado que éstos identifican ocho epítopes (A hasta H) independientes contra la Gp₅₁. Tres de esos epítopes, los llamados F, G y H, están involucrados en la infectividad y en la formación de sincitios de células productoras de VLB así mismo el epítape H es el blanco para la citotoxicidad dependiente de complemento mediada por anticuerpos. La integridad de estos epítopes depende de la integridad del carbohidrato unido, dado que la remoción de las cadenas de carbohidratos por tratamientos con glicosidasas específicas eliminan la unión de anticuerpos séricos de animales infectados con esta proteína. Así mismo, el tratamiento de las células FLK-VLB con tunicamisina producen el precursor de la Gp₅₁ y se reconoce en él los sitios antigénicos de la A hasta la E pero no los epítopes F, G y H. (9,38).

La transcriptasa reversa del BLV (TR-VLB) posee un peso aproximado de 70kD es una polimerasa de DNA dependiente tanto de RNA como de DNA y tiene una fuerte preferencia sobre el ión magnesio como catión divalente. Un posible precursor de esta proteína es un producto de 145,000 daltons se ha detectado en células infectadas con BLV (38). La TR-VLB es antigénicamente

distinta de las transcriptasas reversas de los retrovirus del sarcoma del simio, leucemia murina y mieloblastosis aviar (48).

3.3. Manifestaciones clínicas en bovinos positivos a VLB.

La transmisión horizontal en condiciones naturales es la principal vía de infección en los bovinos susceptibles, una vez que el animal adquiere el virus se considera que permanece con él de por vida (22,107) y aunque no se detecten viriones en circulación existe una fuerte reacción serológica contra las proteínas estructurales del VLB (27,53), la mayoría de los animales infectados permanecen clínicamente sanos y no existen indicios marcados de baja en la eficiencia productiva (principalmente en los primeros meses), no obstante se reconoce que el virus provoca tres síndromes (35,66) conocidos como:

- 1) Portador Sano Asintomático (PSA)
- 2) Linfocitosis Persistente (LP)
- 3) Linfosarcoma Enzoótico Bovino (LEB)

Algunos estudios señalan que la presentación de los tres síndromes anteriores dependen de ciertos factores, entre los cuales se incluyen genéticos y ambientales (36,61).

El LEB se considera la forma maligna de la enfermedad y se estima[®] que ocurre en alrededor del 0.1 a 10 % de animales portadores del virus (31,73), esta condición presenta un pico de incidencia en animales con edades entre 4 y 8 años (36,49), presentando alteraciones clínicas diversas que dependen del órgano o tejidos afectados por la infiltración linfoide (1,2,16,50,90,111), de esta forma, si los nódulos linfoides externos (sublumbares, e inguinales internos, principalmente) son los afectados el diagnóstico clínico se facilita, sin embargo, éste se torna difícil si el desarrollo del tumor se ubica en nódulos, órganos o tejidos internos; de estos últimos los frecuentemente afectados son el corazón, abomaso, útero, riñones, canal espinal y la región retroorbital (2,16). El LEB a

menudo invade el tracto gastrointestinal, principalmente el abomaso, provoca obstrucción y ulceración que originan anorexia y pérdida de peso (4,49). La infiltración linfoide en el cordón espinal y miocardio, inducen a alteraciones neurológicas y cardíacas, respectivamente (50). El desarrollo de tumores en la región retrobulbar también se han reportado, aunque éstos se presentan con baja frecuencia, (menos del 17%) en los animales con LEB generalizado (90).

La frecuencia de los signos clínicos reportados por Reed (91) en estudios de campo de 1100 bovinos afectados por LEB incluyen: pérdida de peso, baja en la producción de leche, linfadenopatía interna, paresis posterior, fiebre, signos respiratorios, exoftalmo bilateral, diarrea, constipación y signos cardiovasculares.

Los animales con linfoma presentan alteraciones inmunológicas celulares y humorales (26,47), en el primer caso existe un descenso en el número relativo de linfocitos T con una pobre respuesta a la estimulación con varios mitógenos mientras que en el segundo, las concentraciones de IgM están reducidas o no se evidencian y la afinidad de los anticuerpos está muy reducida (47).

Por otra parte, el estado de LP se considera una respuesta benigna y se presenta en alrededor de un 30% a un 70% de los animales afectados por el virus, esta condición se caracteriza por un aumento en las cuentas de linfocitos B (26,36) y se define como un aumento prolongado en el número de linfocitos absolutos al menos tres desviaciones estándar por arriba del promedio normal, de acuerdo a la edad y raza (47). Esta condición debe persistir por lo menos tres meses consecutivos y los animales no manifiestan alteraciones clínicas de sugestivas de linfoproliferación.(36,50). Las implicaciones económicas de esta condición clínica no están bien establecidas, no obstante se ha observado que animales seropositivos tienen un promedio de vida más corto, tienen menor producción láctea y por consecuencia son desechados prematuramente del hato que los animales seronegativos al VLB (9,97).

Varios antígenos de linfocitos bovinos (BoLA), determinan en cierta medida la resistencia o susceptibilidad para el desarrollo de LP, Lewin y Bernoco, emplearon alloantisueros para determinar asociación entre haplotipos y fenotipos de BoLA en animales infectados con VLB sin LP y con LP (61). Los animales BoLA-w8 tienen mayor probabilidad de estar seropositivos, mientras que los animales con BoLA-DA7 seropositivos son resistentes a desarrollar LP, mas no así los BoLA-DA12.3 que tienden ser más susceptibles a presentar LP.

3.4. Epizootiología.

Los estudios epizootiológicos deben de diferenciar la distribución de LEB a la distribución de infección por VLB, el primero describe la incidencia del tumor y la última la del virus (50). Antes del aislamiento del VLB y del desarrollo de técnicas serológicas sensibles para detectar la infección, los estudios epizootiológicos se apoyaban en los índices leucocitarios y presencia de linfosarcoma en los animales sospechosos, sin embargo, tales parámetros resultaban ser un deficiente indicador de la infección por VLB (31,36).

El LEB es el segundo tumor más común de los que afectan al bovino, sin embargo, es la neoplasia hemolinfática más frecuente (47). Esta frecuencia es difícil de determinar, lo cual se refleja en la variabilidad de los reportes de incidencia en diferentes zonas. Los rangos de incidencia de linfoma reportados para los Estados Unidos de América varían de 20 a 84 por cada 100,000 bovinos sacrificados (36,50,73,104).

El desarrollo de LEB, LP y PSA en los animales infectados está influenciado por factores virológicos, serológicos e inmunológicos, además de existir cierta predisposición genética para el desarrollo del linfoma y linfocitosis persistente (37,61).

Los estudios serológicos realizados en los diversos continentes revelan que la infección por VLB está ampliamente difundida (8,13,16,25,28,65,101).

Sin embargo, la seroprevalencia varía acorde a la zona, el tipo de producción, edad, e historia previa de linfosarcoma en el hato (31,35,36).

Europa es el continente con mayor interés en erradicar la infección por VLB y así, se han realizado diversos estudios para ubicar la distribución de este virus. En países como Francia, Italia, Alemania, se han reportado prevalencias relativamente moderadas mientras que en Suiza, Holanda, Inglaterra, Irlanda, Portugal, la prevalencia es baja (100).

En América también se han realizado estudios epizootiológicos de la infección por el VLB (8,13,25,28,60,65,77,92,105,115). Una investigación serológica realizada en Canadá en 1978 demostró que el 40% de los hatos lecheros y el 11% de los hatos productores de carne están infectados, no obstante en este mismo trabajo se encontraron anticuerpos en el 9.3% de las vacas destinadas a la producción láctea y sólo 0.5% en el ganado productor de carne (51,91), por otra parte, el porcentaje de hatos infectados en la provincia de este país varió desde 0 hasta 60% y alrededor de 90% en los estados de la zona central (21).

Se calcula que la prevalencia de infección en los E.U.A. fluctúan entre 10% y 48% en los bovinos lecheros, no obstante, se estima que del 60% al 92% de los hatos destinados a la producción de leche se encuentran infectados y el ganado productor de carne presenta seropositividad desde el 0.5% a 19%, permaneciendo infectados el 14% de estos hatos (13,21,44,45).

Aunque a finales de los 60's el Linfosarcoma Enzoótico Bovino se diagnosticó por primera vez en la república Mexicana (4), los estudios seroepidemiológicos hasta la fecha han sido escasos; en 1983 Suzan y col. (101) muestrearon ganado lechero y de carne en varios estados de la república, determinaron que el 36% de los lecheros y el 4% de los productores de carne están infectados, estudios similares realizados por Monroy y col. en Tamaulipas y Puebla reportan prevalencias elevadas con 54% y 18% respectivamente (77), en

este mismo año Larios y col. al estudiar una población de bovinos de carne y sus cruza en una zona subtropical, encontraron una seroprevalencia general de 17%, determinando mayor índice de positivos en la raza pardo suizo, seguido de la Indobrasil (57), por otra parte, Espada y col. en 1986, buscaron anticuerpos contra VLB en bovinos lecheros sacrificados en el rastro de Baja California detectando 32% de seropositividad (25). En el noreste de México, previamente se determinó una seroprevalencia general de 3.19% (105) y una alta frecuencia serológica en hatos lecheros cercanos a zonas urbanas (115). Al igual que los anteriores estudios se evidenció que de acuerdo al tipo de explotación los bovinos lecheros son los más afectados.

Se ha determinado que la prevalencia de infección del virus de la leucosis bovina aumenta conforme se incrementa la edad (13,14,30,44), presentando mayor índice de seropositivos los animales con edades de 2 a 3 años comparados con los animales de 1 a 2 años, no obstante que después de 3 años la infección permanece relativamente estable según el manejo del ganado (21).

El tamaño y antecedentes previos de linfosarcoma en el hato, determinan en cierta medida los porcentajes de seropositividad ya que hatos con baja población tienden a tener altas proporciones de seropositivos (44,115), mientras que en poblaciones con antecedentes de la forma maligna de la enfermedad, la probabilidad de encontrar seropositivos es mayor que en los hatos en donde no existen antecedentes de presentación de la enfermedad (31,73,86).

La transmisión horizontal es la principal causa de infección por VLB en la población bovina, el virión aún no se ha podido detectar "in vivo" y se asume que el ganado se infecta al entrar en contacto con linfocitos que portan el provirus; de esta forma, cualquier medio, ya sea natural o artificial, que resulte en la transferencia de linfocitos entre la población bovina resulta importante para que el virus se transmita. (21,22).

En condiciones naturales, la transmisión por contacto es la principal vía a través de la cual el VLB se difunde (21,58), no obstante, la infección in utero es de frecuencia baja (1.2-1.6%) y la probabilidad de infección está asociada con la prevalencia del VLB en el hato (60), a las prácticas de manejo (59), la función zootécnica (21) y probablemente a la estación y presencia de insectos (22,51).

3.5. Diagnóstico serológico de la infección por VLB.

El diagnóstico de la infección por VLB, es uno de los factores principales para el control y la erradicación del virus (21,50,52,54). Una vez que el animal se infecta permanece así de por vida, produce anticuerpos contra varias proteínas estructurales del virus (38,41) y contra antígenos asociados a tumor en células linfosarcomatosas (3).

Actualmente, la detección serológica del VLB es la manera más práctica para evidenciar la infección, en vez de encontrar estados linfocíticos o linfosarcomatosos, y existen varios procedimientos para este propósito (27,50).

Las pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico del VLB incluyen la Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG), Fijación de Complemento (FC), Radioinmunoensayo (RIA), Ensayo Inmunológico Ligado a Enzima (ELISA) y Virus Neutralización (VN) (27,32,34,37,40,70,71).

La prueba de Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG), empleando como antígeno la Gp₅₁ del VLB es comúnmente empleada dada su sensibilidad, simplicidad, reproducibilidad, fácil ejecución y bajo costo (70), de hecho, es la prueba oficialmente aceptada por los países de la Comunidad Económica Europea para el diagnóstico de VLB (43). La IDAG resulta ser un indicador confiable de la infección por VLB (54,75) y se correlaciona bien con la infección con un alto grado de especificidad (debido en parte a la estabilidad genética del virus)(17,72). Variaciones en algunos elementos (pH, Molaridad y tipo de Buffer, tiempo de incubación, tinción de complejos precipitantes, etc...) que involucran la prueba de

IDAG no aumentan la sensibilidad cuando se comparan con los ensayos inmunoenzimáticos, de los cuales se han empleado las técnicas de ELISA (40) y Western Blot (41).

Con ELISA se pueden analizar eficientemente un gran número de animales, además es segura, rápida y sensible. Esta prueba se ha estandarizado a través del método indirecto (recomendado para serología), para detectar anticuerpos tanto en suero (37,40) como en leche (10,14), utilizando para ello una variedad de antígenos (en diferentes cantidades) del virus dentro de los cuales destaca la Gp₅₁ purificada ya sea a partir de sobrenadantes de cultivos celulares (FLK-BLV(49), BL-BLV(110) o de viriones purificados (40). Generalmente se ha empleado como anticuerpo secundario anti-IgG bovina inducida en conejo y marcada con peroxidasa y las variaciones se han ubicado en el tipo de Buffer, Bloqueador o número de lavadas (40,76,81).

Los grupos de Investigadores que han comparado la sensibilidad entre ELISA e IDAG han determinado que la primera es superior como se muestra a continuación.

Ressang y col. examinaron un total de 2784 sueros y encontraron una diferencia de 0.5% entre ELISA e IDAG (110).

Graves y col. compararon la sensibilidad de ELISA con el ensayo de inhibición de la policariocitosis temprana (AIPT) y con al IDAG-Gp₅₁, determinaron 96.2% de concordancia entre los resultados de las pruebas sin embargo la AIPT detectó el mayor número de positivos seguido de ELISA e IDAG (40).

Por otra parte, Floret en 1988 (37) y Nguyen y col. en 1993 (81) utilizando Gp₅₁ purificada a partir del VLB, lograron la detección de anticuerpos en leche y/o en suero, de animales infectados. El primer autor encontró con ELISA entre 10% y 30 % más animales positivos que con IDAG, , mientras que los últimos, detectaron 25 sueros positivos de 45 y 15 muestras de leche de 30

animales con signos de leucosis que previamente resultaron negativas para IDAG.

Por otra parte, el método de Inmunoelectrotransferencia (WB) también se ha empleado para detectar anticuerpos anti-VLB (41,109). Walker y col. (109) aplicaron esta metodología y detectaron anticuerpos contra todas las proteínas de los viriones de VLB y contra antígenos de pesos moleculares aproximados de 55,100, y 150 Kd obtenidos a partir de concentrados de células infectadas con VLB. El WB claramente evidenció reacciones contra la P₂₄ en 21 sueros de bovinos que anteriormente resultaron dudosos en la IDAG-Gp₅₁.

También, Grover y Guillemain (1992)(41) encontraron similares resultados usando viriones purificados y suero de referencia positivos a IDAG, ELISA y RIA. Al comparar las pruebas de IDAG, ELISA e IET, éstas presentaron concordancia en 49 sueros (31 negativos y 18 positivos), sin embargo, 21 sueros resultaron positivos por IET y negativos para ELISA e IDAG.

Con estos resultados se indica que la IET es más sensible que otras pruebas serológicas, además, con la ventaja de poder definir tanto la intensidad como la especificidad de la reacción.

Una de las aplicaciones prácticas de estas metodologías inmunoenzimáticas radica tal vez en que la presencia del virus puede detectarse a partir de leche, la cual es relativamente más rápida y sencilla de obtener que el suero.

3.6. Detección del provirus del VLB.

El uso de pruebas de detección de ácidos nucleicos virales específicos como la amplificación selectiva de un segmento genómico (PCR) o hibridación a una sonda de ácido nucleico marcada, se ha incrementado notablemente como el medio preferido para un rápido diagnóstico. Los métodos para el diagnóstico (Serología, Microscopía electrónica, Aislamiento viral) no solo de VLB sino de la

mayoría de las infecciones retrovirales carecen de sensibilidad para detectar el virus en etapas muy tempranas de la infección (29).

Los procedimientos que se han reportado para detectar al ácido nucleico del VLB son la Hibridación *in situ*, el Southern blot, el Dot blot y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (2,7,18,48,74,80,83,88,97).

Con el uso de la hidridación *in situ* con sondas biotiniladas o radioactivas se ha logrado detectar transcritos de RNA del VLB en linfocitos sanguíneos periféricos, estimulados con concanavalina A ó phytohemaglutinina y en células linfosarcomatosas (83,89).

Con la técnica de Southern blot se ha logrado determinar provirus “integrado” del VLB en el DNA genómico de tejido linfosarcomatoso de ovejas infectadas (82); así como en linfocitos T ayudadores y citotóxicos/supresores de bovinos linfocíticos (99).

Sin embargo, el uso de sondas moleculares para detectar al VLB por medio de Southern blot o Dot blot tiene un éxito parcial, debido al bajo límite de detección por ambos métodos en situaciones de campo (1 célula infectada por 10 a 100 linfocitos) (2), de tal forma que la técnica de PCR se ha empleado con mayor éxito para la detección temprana de la infección por VLB (2,7).

Con el propósito de aplicar el PCR para la detección temprana del VLB en animales (ovejas) infectados, Brandon y col. amplificaron una región del gen ENV (desde nucleotido 5099-5120, 5'-3' hasta 5521-5542, 3'-5'), en su experimento cuatro de seis animales resultaron positivos una semana después de la infección, y lograron detectar el provirus en 10 pg de DNA en la muestra (7).

Murtaugh y col. (97), también aplicaron esta metodología para detectar el VLB en el DNA de células mononucleares sanguíneas de animales seropositivos y seronegativos, utilizaron como “primers” regiones conservadas de los genes GAG, (1109-1128, 5'-3'y 1315-1335, 3'-5'), POL (5042-5061,5'-3' y 5457-5476,3'5') y

ENV (2791-2812, 5'-3' y 3367-3387, 3'5') con un sistema de amplificación suficiente para detectar un genoma viral en 100,000 células.

Sherman y col. diseñaron “primers” que amplificaron regiones de los genes pol y pX-VLB; los “primers” detectaron hasta 10 copias de DNA-VLB contenido en plásmidos mezclados con 1µg de ADN humano o bovino. Estos autores, encontraron una concordancia entre el resultado serológico con Radioinmunoensayo y el PCR realizado con ADN obtenido de mononucleares sanguíneos de vacas infectadas y no infectadas (97).

Kelly y col. compararon la detección temprana de la infección por el VLB con las metodologías de PCR e IDAG. Estos investigadores diseñaron oligonucleotidos para amplificar una región de 375bp del gen gag, encontraron positividad 7 días después de inocular a los animales y concluyeron que el PCR puede no ser útil para propósitos de detección rutinaria, pero que es recomendable realizarla en aquellas situaciones en que se desea detectar animales seronegativos pero infectados (55).

Recientemente, algunos investigadores han medido la eficacia del PCR bajo situaciones de campo (2,78), concluyendo que esta técnica tiene aplicabilidad práctica para detectar becerros infectados, a pesar de la presencia o ausencia de anticuerpos calostrales, permitiendo esta observación remover inmediatamente la fuente de infección para el hato.

3.7. Importancia económica de la infección por VLB.

Las consecuencias económicas de la infección por el virus de la leucosis bovina son difíciles de estimar; sin embargo, para evaluar su impacto es necesario tener en cuenta factores como la prevalencia viral, susceptibilidad genética del animal para desarrollar la forma maligna, decomiso en el rastro, restricciones para exportar animales procedentes de zonas positivas, así como capacidad productiva y reproductiva de los animales infectados (8,45,46, 54, 56, 61,92).

Thurmond et.al. (103) al analizar la edad (2-7 años) en que las vacas lecheras seropositivas o seronegativas son desechadas en un hato de 200 en producción encontraron que los animales seronegativos sobrevivían más de 3.5 años, de esta forma el aumento en el período de permanencia en el hato puede influenciar en la eficacia económica del mismo. Estos mismos investigadores sugieren que la infección por VLB incrementa la probabilidad de desecho debido a un efecto adverso sobre la productividad, causado por alteración de los procesos fisiológicos y a la presencia de cantidades subclínicas de tejido neoplásico. No obstante existen controversias de la influencia del VLB en la economía del hato lechero, en una investigación realizada en Chile, se determinó que la Leucosis Bovina Enzoótica no interviene de manera importante para que se presenten problemas de mastitis, abortos o infertilidad; sin embargo, la producción láctea sufre una pérdida promedio de 156 kg corregida al 3.5% de grasa por cada lactancia en el animal (8).

Por otra parte, estudios realizados en E.U.A. en diferentes hatos; encontraron que vacas positivas o negativas en producción no presentaron diferencias promedio significantes, en parámetros como producción láctea y eficiencia reproductiva (56); así también, Huber et. al. (45) encontraron tendencias no significantes en los promedios de producción y variables reproductivas entre vacas seropositivas o seronegativas, así como en el riesgo relativo para desarrollar mastitis o en la sobrevivencia 3 durante años.

Wu et. al. (111), compararon la producción de leche y grasa en leche en vacas agrupadas de acuerdo al estado subclínico de infección por VLB (LP-seropositivos, PSA-seropositivo y normal-seronegativo) y encontraron que la producción de leche fue más alta en vacas seropositivas con LP que su potencial genético, mas no así la producción de grasa en leche, al sugerir que la infección temprana con VLB se asocia positivamente con la producción de leche es

4. MATERIAL Y METODOS

4.1. Ubicación de las zonas muestreadas

Los Municipios muestreados de la zona Noreste, la función zootécnica y la cantidad de animales estudiados se presenta en el Cuadro I, mientras que la distribución relativa de las zonas muestreadas en los Estados se ubican en la Figura 1.



Figura 1. Distribución relativa de las zonas muestreadas (□) en el noreste de México para detectar anticuerpos contra el Virus de la Leucosis Bovina (VLB) en suero de bovinos.

4.2. Toma de muestras, separación de suero y mononucleares sanguíneos periféricos (MSP).

De los bovinos se extrajo sangre venosa a partir de las venas coccigeas ó yugular, empleando tubos al vacío (13 x 100) y agujas tipo “Vacutainer” (calibre 21 x 38 [21 x 1 1/2]).

Para obtener el suero, la sangre se dejó coagular a temperatura ambiente y se almacenó en refrigeración hasta la llegada al laboratorio, en donde se separó

por centrifugación a 2,000 rpm. durante 10 minutos, el suero se succionó con pipetas pasteur depositándose aproximadamente 2 ml. en viales de vidrio y previa etiquetación se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Para la obtención de MSP, se extrajeron 3 ml de sangre en tubos al vacío con EDTA de cada animal seleccionado. La sangre se mantuvo en refrigeración (no más de 8 h) hasta que fue centrifugada a 1500 rpm durante 30 m. Después de la centrifugación, se removió la capa leucocitaria y se resuspendió en 1 o 2 ml. de SSF.

La suspensión se depositó cuidadosamente en 4 ml de Ficoll-Paque y se centrifugó a 2000 rpm durante 30 m. a 22°C, los MSP se aspiraron, ubicados en la interfase entre el Ficoll y la SSF, y se lavaron 2 veces en 30 ml de SSF estéril, centrifugándose a 1000 rpm durante 10 y 5 minutos sucesivamente; al final se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1.2 ml de medio RPMI con SFB al 10% y antibióticos, se determinó la cantidad de MSP por método de exclusión con azul tripano y se ajustó a una concentración de 5×10^6 por ml.

4.3. Cultivo celular y obtención de antígenos.

4.3.1. Cultivo de Mononucleares sanguíneos periféricos (MSP) y obtención de antígenos en sobrenadante celular (ASC).

Los MSP ajustados a 5×10^6 por ml en medio RPMI con SFB al 10%, concanavalina A 5µg/ml y antibióticos y se incubaron durante 48 horas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 80% humedad. Después de este período, los MSP y el sobrenadante se separaron por centrifugación, los primeros se almacenaron para posteriormente extraer el DNA celular, mientras que el último se colectó en viales y se mezcló con una suspensión formalinizada al 1% de la cepa Cowan de *Staphylococcus aureus* durante 18 horas a 4°C, después se eliminaron las bacterias por centrifugación (3000 rpm x 10 minutos) y las

proteínas del sobrenadante (ASC) se precipitaron con polietilenglicol al 8% para su empleo posterior en el Inmunoblot.

4.3.2. Cultivo de células de riñón de cordero persistentemente infectadas con VLB (FLK-VLB) y producción de antígenos solubles.

Las células persistentemente infectadas con el virus de la leucemia bovina (FLK-VLB), en el pase 79, se cultivaron a 37.5°C, con 5% de CO₂ y 80% de humedad relativa en cajas de 25 cm² con medio esencial mínimo, antibiótico (Penicilina-Estreptomicina) y suero fetal de bovino al 8% (medio de mantenimiento, ver Apéndice), hasta obtener aproximadamente 95% de confluencia celular.

A partir de una caja confluyente se realizaron subcultivos a razón de 1:4, usando versenato de sodio al 0.05% como disgregador celular, distribuyéndose en cajas del mismo tamaño y se incubaron en las mismas condiciones. Cuando se obtuvo una confluencia cercana al 80%, tres de las cajas se disgregaron y se sembraron individualmente en cajas de 175 cm², mientras que la cuarta caja se procesó para conservarse en congelación. A las cajas de 175cm² se les permitió llegar a confluencia, tiempo en el cual se les disminuyó la concentración de SFB a 5% (medio para producción de antígenos, Apéndice) dejándose en estas condiciones durante 4 días, se recolectó el sobrenadante y se subcultivó (1:2) dejándose con la misma concentración de SFB y así sucesivamente hasta que se obtuvo aproximadamente 3 litros de sobrenadante, mismo que se almacenó a -20°C hasta su uso en la etapa de purificación.

4.3.2.1. Purificación de la Glicoproteína 51 (Gp₅₁) del VLB.

El sobrenadante se descongeló y se clarificó por centrifugación a 1000 g durante 10 minutos. Las proteínas en suspensión se precipitaron con sulfato de amonio a razón de 30% durante 72 h. a 4°C.

Las proteínas precipitadas se dejaron sedimentar y se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 m. (desechándose el sobrenadante), el sedimento resultante se resuspendió en PBS hasta aproximadamente 1/10 del volumen originalmente precipitado, esta suspensión se dejó toda la noche a 4°C y el precipitado formado durante este período se eliminó por centrifugación a 2500 rpm. x 30 minutos.

El sobrenadante recolectado se dejó fluir a través de una columna conteniendo Sepharosa-Con A (Apéndice) con 8 ml de volumen de cama y se eluyó con PBS hasta no detectar absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro de luz ultravioleta. Posteriormente, las glicoproteínas y azúcares unidos a la matriz de Sepharosa-Con A, se desprendieron con 0.1 M de Alfa-metil-D-Manosidasa y se recolectaron en viales de 1 ml.

Los viales se almacenaron a 4°C y después se determinó la presencia de la Gp₅₁ con antisueros positivos y negativos de referencia empleando la técnica de IDAG.

4.4. Detección de anticuerpos contra el Virus de la Leucosis Bovina (VLB).

4.4.1. Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG).

Se empleó agarosa disuelta al 0.8% en Tris-HCl 0.05 M. con 8.5% de NaCl (pH 7.2). La agarosa se fundió con calor y se vaciaron 8 ml en cajas de petri de plástico de 80 mm de diámetro, una vez solidificada, a temperatura ambiente durante 1 hora, se realizaron hoyos de 8 mm de diámetro sobre el gel, procurando una distancia entre cada pozo de 2.5 mm. en un patrón de siete hoyos (Figura 2).

El antígeno (Gp₅₁ del Virus de la Leucosis Bovina) se colocó en el orificio central mientras que los sueros de referencia (positivos y negativos) y los sueros a probar se distribuyeron alternadamente.

La caja de petri se incubó a temperatura ambiente, en una cámara humedecida con 2% de formol, durante 48 horas. Se consideraron como positivos aquéllos que presentaban línea de continuidad con los controles positivos.

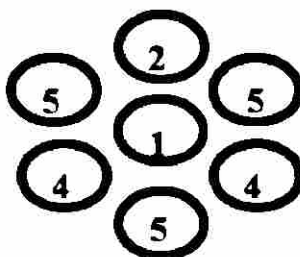


Figura 2. Patrón utilizado en la prueba de Inmunodifusión en Agar Gel.

1. Antígeno glicoprotéico 2. Suero de referencia positivo 3. Suero de referencia positivo débil positivo
4. Suero de referencia negativo 5. Sueros sospechosos

4.4.2. Ensayo Inmunológico Ligado a Enzima (ELISA).

La glicoproteína, previamente obtenida en la etapa de purificación, se ajustó a una concentración de $1\mu\text{g} \times 100\mu\text{l}$.

La sensibilización de las microplacas de ELISA, se efectuó al depositar $100\mu\text{l}$ de la solución de glicoproteína a cada pozo y permitiendo adsorber toda la noche a temperatura ambiente. Después de este período se extrajo la solución y se almacenó en refrigeración. El bloqueo se llevó a cabo agregando a cada pozo $110\mu\text{l}$ de solución bloqueadora (Tris-HCl+ 0.15% de Tween 20 a pH 7.2) y se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente, después, las placas se enjuagaron 2 veces con el Buffer de lavado (Tris-HCl + 0.05% de Tween 20) y se sacudieron para quitar el exceso de buffer.

Finalmente, las placas se cubrieron, etiquetaron y almacenaron a 4°C y se usaron en un período no mayor a 45 días.

Para la determinación de Anticuerpos contra VLB en el suero del animal, cada muestra se diluyó 1:10 en Buffer de dilución (Tris-HCl, 0.15% de tween 20, 0.5% de Albumina de Huevo, pH 7.5) y se colocaron $50\mu\text{l}$ por duplicado, durante

dos horas a temperatura ambiente, después cada pozo se lavó 4 veces con Buffer de lavado.

El anticuerpo anti-IgG bovina marcado con fosfatasa alcalina, diluido 1:5000 en Buffer de lavado, se agregó (100µl) a cada pozo, se incubó 1 hr. a temperatura ambiente, después se retiró el conjugado y se lavó 4 veces, después de la última lavada se le agregó a cada pozo una solución recién preparada de NPP (5mg/5ml de Buffer de Diethanolamina-HCl 0.1M pH 9.8 + 1_mM MgCl₂), se dejó incubando durante 1 hr. y se registró la absorbancia a 405 nm. Las lecturas se repitieron cada hora en tres ocasiones.

La distribución de los "blancos", sueros controles (+/-), el suero fetal y los sospechosos se observa en la figura 3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Bco	Bco										
B	Bco	Bco										
C	+	+										
D	Pol	Pol										
E	SFB	SFB										
F	-	-										
G	*											
H	**											

Figura 3. Esquema de distribución de los sueros sospechosos y controles negativos y/o positivos al Virus de la Leucosis Bovina en la microplaca de ELISA.

Bco = Blanco, pozo con el mismo proceso pero sin agregar suero

POL Mezcla de 10 sueros (1 ml c/u) de bovinos lecheros positivos a IDAG

****** Pozo con antígeno pero sin agregar el anticuerpo marcado

SFB = Suero Fetal Bovino

- = Suero control negativo (donado por Van Der Maaten) USDA, NADC

□ Suero sospechoso

+ = Suero control positivo (Leukoassay, Pitman Moore)

***** Pozo sin antígeno y tratado con el mismo proceso

■ Duplicado de suero sospechoso

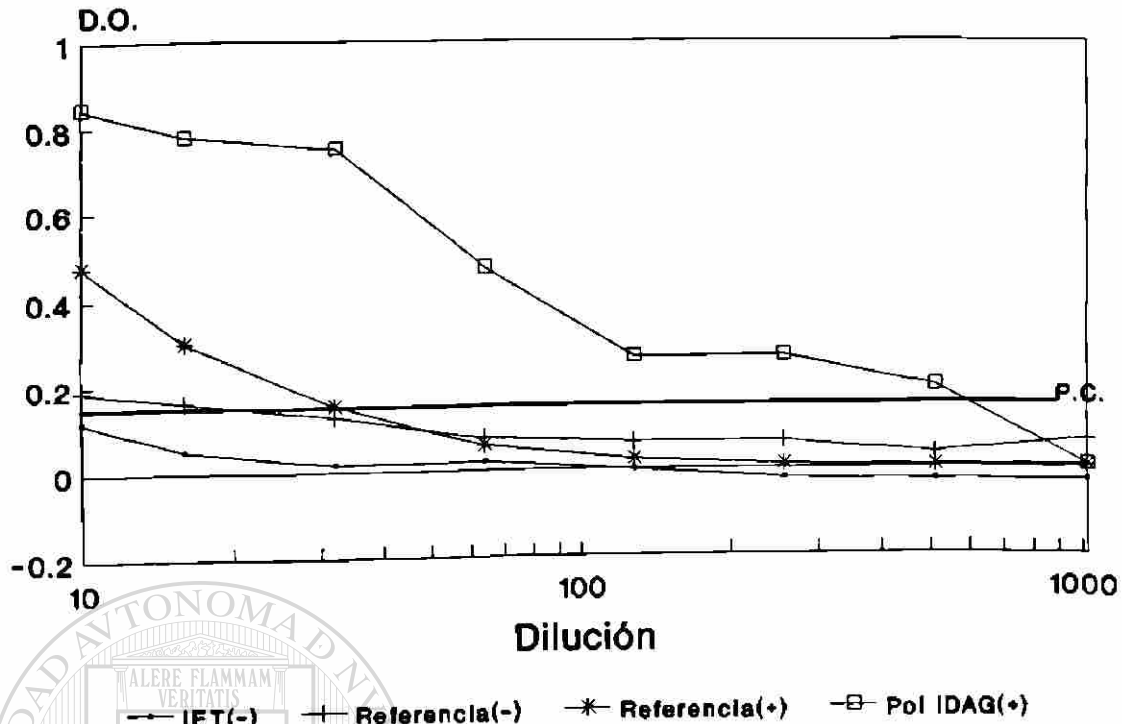


Figura 4. Curva de referencia y punto de corte obtenida con los sueros controles en la prueba de ELISA.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.4.2.1. Curva de referencia y establecimiento del punto de corte en ELISA.

Se emplearon tres repeticiones para obtener la curva de referencia y el punto de corte (0.2 D.O.), para discriminar los seropositivos de los seronegativos (Figura 4), empleando controles positivos y negativos de referencia, además de un suero negativo a Inmunoblot y una mezcla de 10 sueros positivos en IDAG.

4.4.3. Inmunoelctrotransferencia (WB)

Para la detección de anticuerpos anti-Gp₅₁ y anti-P₂₄ del VLB en vacas sospechosas, se emplearon los antígenos glicoprotéico, "dual" y el sobrenadante de MSP cultivados de algunas vacas que previamente resultaron positivas. Los antígenos se separaron electroforéticamente en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida. Los antígenos se ajustaron a 1 mg/ml, se calentaron a 100°C durante 3-5 m. en buffer de muestra y después se inocularon en el gel, aplicándoseles 100V de corriente eléctrica para permitir la separación.

Los antígenos separados en el gel de poliacrilamida se transfirieron durante toda la noche a una membrana de nitrocelulosa con la ayuda del aparato de electrotransferencia.

Se verificó la transferencia hacia la membrana, tiñendo ésta con rojo Posieu al 2%. Posteriormente la membrana fue cortada en tiras que se bloquearon con leche descremada al 25% (en buffer de bloqueo) durante 1 h., después, las tiras se lavaron 4 veces y se dejaron secar a temperatura ambiente.

— El suero de los animales sospechosos y de los controles positivos y negativos se diluyeron 1:200 para incubarse separadamente con las tiras durante una hora a temperatura ambiente, corrido este tiempo, se realizaron varias lavadas y después de éstas, se les agregó un conjugado de fosfatasa alcalina anti-IgG bovina, diluída 1:5000, se incubó durante una hora y se repitieron los lavados. La reacción positiva se evidenció al agregar BCIP+NBTE como substrato de la enzima. La figura 5 muestra la serorreacción obtenida en donde se aprecian reacciones de variable intensidad contra la Gp₅₁ y P₂₄ del VLB.

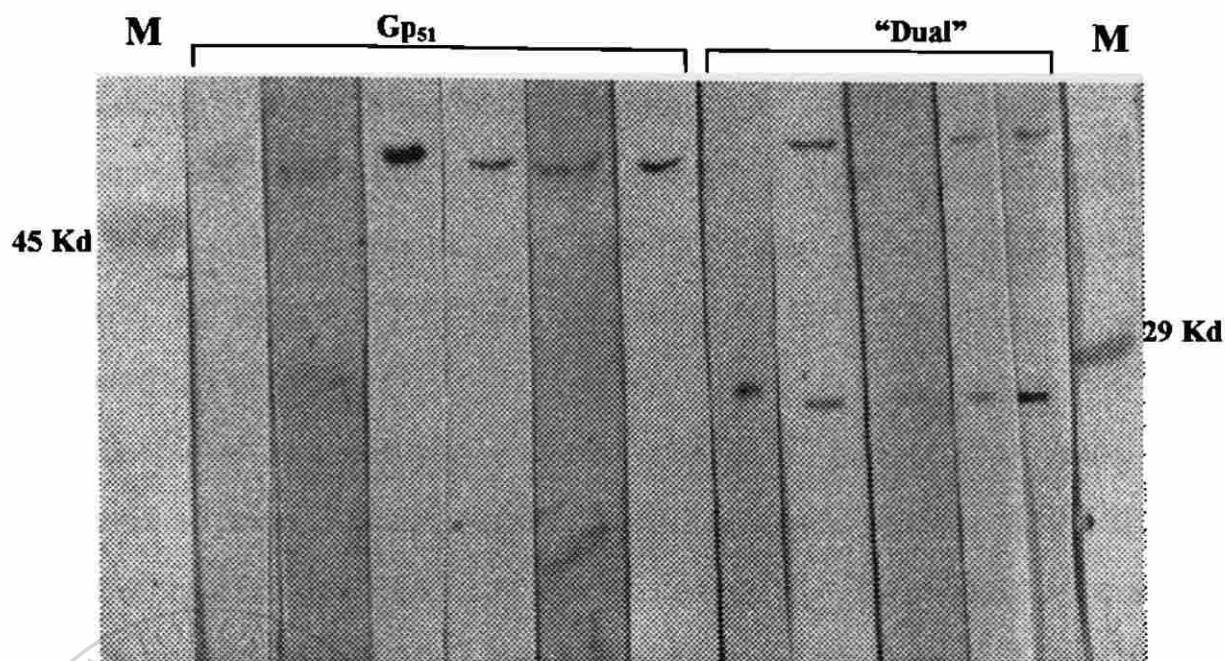


Figura 5. Reactividad obtenida en la Inmunolectrotransferencia con el suero de vacas seropositivas y seronegativas (IDAG) contra las proteínas estructurales Gp₅₁ y P₂₄ del VLB.

4.5. Detección de antígenos del Virus de la Leucosis Bovina

4.5.1. Fijación de complemento.

Se preparó una suspensión estándar de eritrocitos de carnero (SEEC), para lo cual se diluyeron 10 ml de sangre de carnero con un volumen igual de SSF y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos, se removieron el sobrenadante y la capa leucocitaria, repitiéndose esta operación 3 veces, en la última etapa, los eritrocitos lavados se resuspendieron en tubos graduados de 15 ml y se centrifugaron exactamente a 1500 g por 10 minutos para ajustarse finalmente al 3%.

Para los ensayos se emplearon microplacas de ELISA, depositándose 50 µl de suero positivo (vaca fuertemente seropositiva a IDAG y con evidencia clínica de linfosarcoma) en el primer pozo de cada línea, los pozos se cubrieron con cinta adhesiva y se inactivó el suero colocando la microplaca en baño maría a

56°C durante 1 h., después la cinta se removió y se colocaron 25µl de diluyente del segundo al doceavo pozo de cada línea, se realizaron diluciones dobles seriadas desde el primer pozo hasta el último.

Se agregaron 25 µl de ASC desde el tercer al último pozo, al segundo pozo de cada hilera se le adicionó 25 µl de diluyente como control anticomplementario y después se agregó 25 µl de complemento (50 unidades) a cada pozo exceptuando el primero.

Las placas se sellaron y se incubaron a 37 °C durante 30 minutos, durante este tiempo se preparó la suspensión de eritrocitos sensibilizada (SES) al mezclar volúmenes iguales de SEEC con hemolisina (1:8), esta mezcla se mantuvo a temperatura ambiente por 15 m. con agitación constante.

Después de la etapa de incubación, a las microplacas se les agregó 25 µl de la suspensión de eritrocitos sensibilizados a cada pozo, exceptuando el primero. La placa se cubrió de nuevo y se incubó a 37 °C por 30 minutos con agitación constante. La placa se mantuvo en refrigeración durante 2 horas para la sedimentación de los eritrocitos, y el sobrenadante de cada pozo se obtuvo por aspiración y se depositó en un tubo eppendorf para leer la absorbancia (densidad óptica) en un espectrofotómetro a 540 nm.

4.5.2. Inmunoelectrotransferencia (WB)

Las proteínas del sobrenadante (SCC) obtenido de los cultivos de MSP, previo tratamiento con la cepa Cowan de *S. Aureus*, se separaron electroforéticamente en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida. El sobrenadante se ajustó a una concentración protéica de 1mg/ml, se calentó a 100°C durante 3-5 minutos en buffer de muestra y después para separar los antígenos se inocularon muestras en el gel de poliacrilamida y se aplicó corriente eléctrica de 100V hasta que la banda del colorante llegó al límite del gel. Los antígenos separados se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, se constató

la transferencia (tiñéndola con rojo Posieu) y después la membrana se bloqueo con leche descremada al 25% (buffer de bloqueo) durante 1 h., posteriormente, la membrana se lavó 4 veces (buffer de lavado), se dejó secar a temperatura ambiente y fue cortada en tiras. El suero de animales fuertemente seropositivos a IDAG, los sueros controles positivos y negativos y las muestras a probar se diluyeron 1:200 para incubarse separadamente con las membranas durante una hora a temperatura ambiente, corrido este tiempo se realizaron varias lavadas y después de éstas se les agregó un conjugado de fosfatasa alcalina anti-IgG bovina, diluida 1:5000, se incubó durante una hora y se repitieron los lavados. La reacción positiva se evidenció al agregar BCIP+NBTE como substrato de la enzima. La figura 6 muestra la serorreacción obtenida, aquí se aprecian reacciones de variable intensidad contra la Gp51, P24 y otras proteínas de diferente peso molecular.

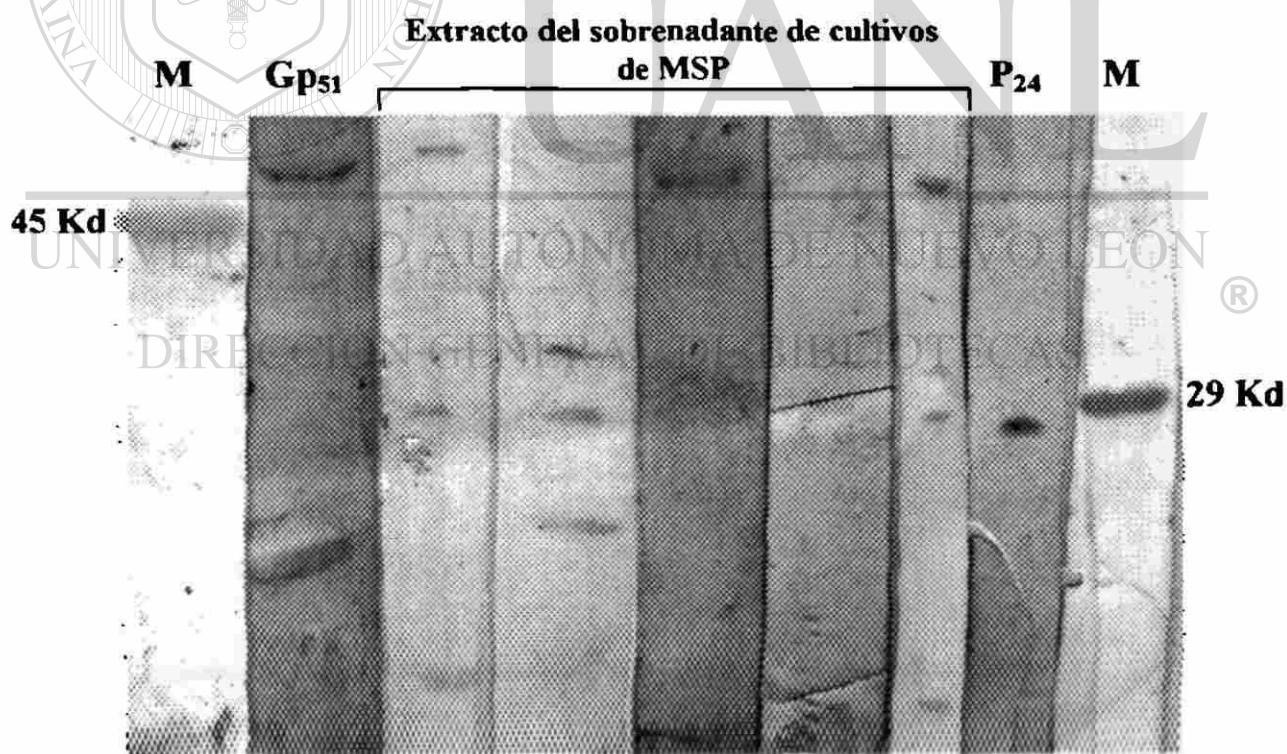


Figura 6. Serorreactividad obtenida contra Gp51, P24 y otras proteínas del sobrenadante de cultivos de linfocitos de vacas seropositivas o negativas a VLB.

4.6. Detección del “Provirus” del VLB

4.6.1 Amplificación y Purificación del plásmido pUC-VLB.

Se utilizó la cepa HD5 α de *Escherichia coli* para la transformación con el plásmido Tax,Rex, “X”-VLB; y sus características se presentan en la figura 7.

Se crearon bacterias calcio competentes, para lo cual, se inocularon 5 ml de medio Luria-Bertani (LB) con bacterias y se dejaron multiplicar durante toda la noche, un ml del cultivo se inoculó en 100 ml de medio LB nuevo incubándose a 37°C con agitación vigorosa a 200 rpm. hasta alcanzar una densidad óptica de 0.3 de absorbancia a 550 nm, inmediatamente después el crecimiento se interrumpió enfriando el caldo en hielo durante 10 minutos y se centrifugó para obtener el paquete bacteriano, una vez decantado el sobrenadante, que se resuspendió en una solución hipotónica de CaCl₂ al 0.1 M, se separaron en alícuotas para usarse el mismo día o congelarse para su uso posterior.

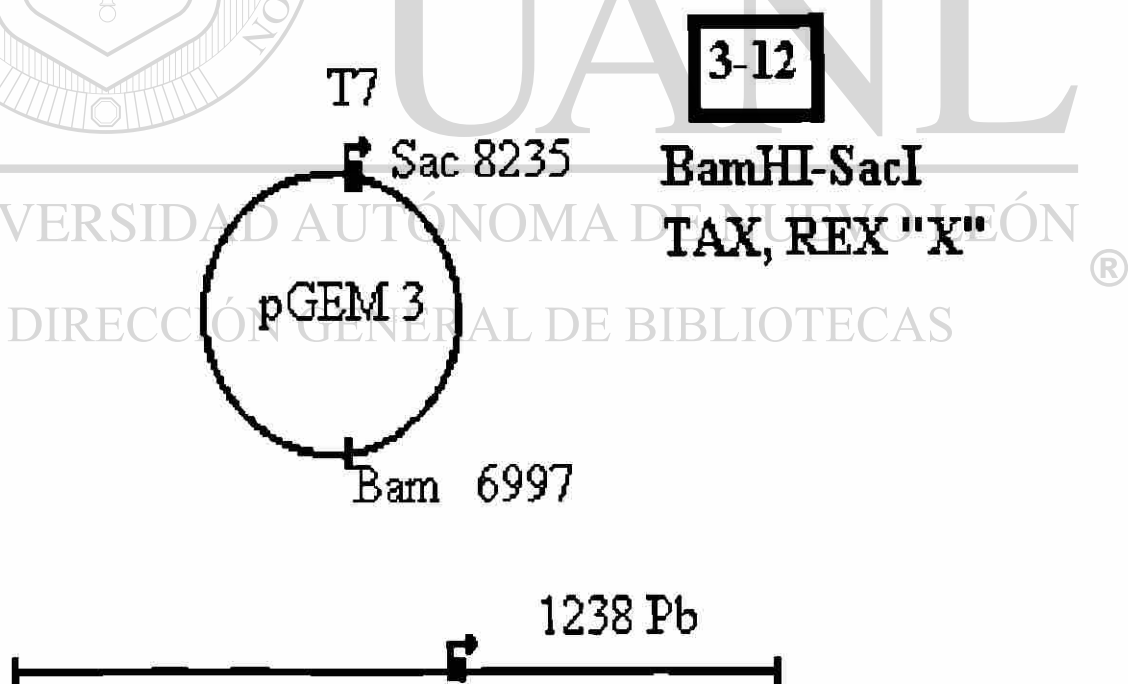


Figura 7. Mapa genético del plásmido pGEM3-Tax,Rex, “X”-VLB, empleado para detectar el genoma proviral del VLB.

Para llevar a cabo la Transformación se preparó una mezcla de 7 μ l de una solución de plásmidos en buffer TE (Tris-HCl[10mM]-EDTA[1mM]) a una concentración de 1 μ g/ml y 20 μ l de bacterias calcio competentes en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se incubó en hielo por 1 hora con agitación suave, posteriormente se produjo un shock de calor a 37°C por un minuto, se adicionó 200 ml de medio LB sin antibiótico y se incubó por 20 minutos a 37°C para permitir la recuperación de los esferoplastos y la expresión del plásmido, posteriormente la preparación se vació en una caja de petri con agar LB y antibiótico (100 μ g/ml de ampicilina) para incubarse toda la noche a 37°C.

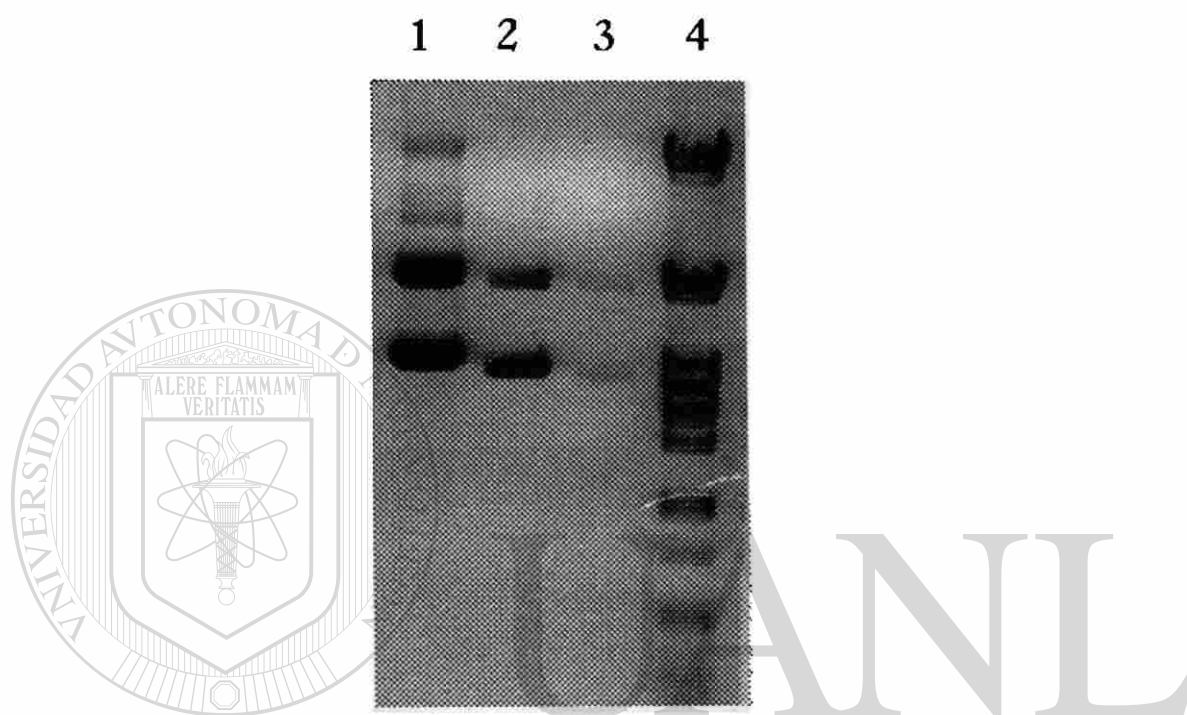
Para verificar la transformación de *E.coli* se realizó la minipreparación de acuerdo a la técnica descrita por Maniantis (64). Las bacterias se multiplicaron en caldo LB con antibiótico, la suspensión se centrifugó y las bacterias se lisaron con SDS al 3% pH 12.3, calentando esta solución a 50°C durante 20 minutos, después la extracción de DNA se realizó con fenol-cloroformo.

Una vez corroborada la presencia de plásmidos en las bacterias, éstos se multiplicaron a gran escala, permitiendo primero, la multiplicación de las bacterias en 20 ml de cultivo durante toda la noche y posteriormente transferidos a un litro de medio LB con antibiótico, incubándose a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una absorbancia de 0.4 a 600 nm, tiempo en el cual se le añadió 250 mg de cloramfenicol y se continuó con la incubación 14 horas más. De aquí en adelante los siguientes pasos se realizaron en frío. El cultivo fue centrifugado y el paquete celular lisado con una solución de 0.2 mg/ml de lisozima con agitación suave y hielo durante 5 minutos, posteriormente se le adicionó EDTA y tritón.

Las células lisadas se centrifugaron y el sobrenadante se aforó a 30 ml con buffer TE, se le adicionó 0.95 gr./ml de CsCl₂ y 1ml de bromuro de etidio, esta solución se colocó en tubos de polipropileno y centrifugada a 230,000 x g por 12 horas a 25°C, el plásmido fue recuperado con la ayuda de una lámpara de luz

ultravioleta y depositado en tubos eppendorf para la eliminación de bromuro de etidio.

Los plásmidos recuperados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en buffer de acetatos a 70 volts constantes, el “corrimiento” electroforético se aprecia en la Figura 8.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Figura 8. Corrimiento electroforético del plásmido pGEM3-Tax-Rex-X-BLV.

Gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio.

1. Plásmido 5-6 (HIND II-BAMH I Tax-Rex-X-BLV)
2. Plásmido 8-44 (BAMH I-HIND II integrasa + Gp₆₀)
3. Plásmido 2-6 (SAC I-BAMH I gag + 2/3 proteasa)
4. Marcador de peso molecular = fago Lambda digerido con Pst I

4.6.2. Extracción de DNA de MSP cultivados.

Los linfocitos cultivados se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml conteniendo 500µl de buffer de lisis (10 mM de tris-HCl, pH 8, 10 mM de NaCl y 10 mM de EDTA), 10 µl de proteinasa K, 50 µl de SDS al 20% y 50 µl de EDTA 500 mM, las células fueron incubadas toda la noche a 55°C, al término de éste período se realizó la extracción de DNA adicionando 500µl de fenol saturado, se agitó suavemente y se centrifugó 4 minutos en la

microcentrífuga. La solución acuosa se removió lenta y cuidadosamente y se depositó en otro tubo nuevo, se repitió este proceso dos veces más y posteriormente a la fase acuosa se le adicionó 2.5 volúmenes de etanol frío (-20°C) y se dejó incubar toda la noche a -20°C , posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante fue eliminado y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente, una vez seca la pastilla se resuspendió con buffer TE. Para determinar la cantidad e integridad del DNA, éste se “corrió” en geles de agarosa al 0.8% a 70 voltios constantes (figura 9).

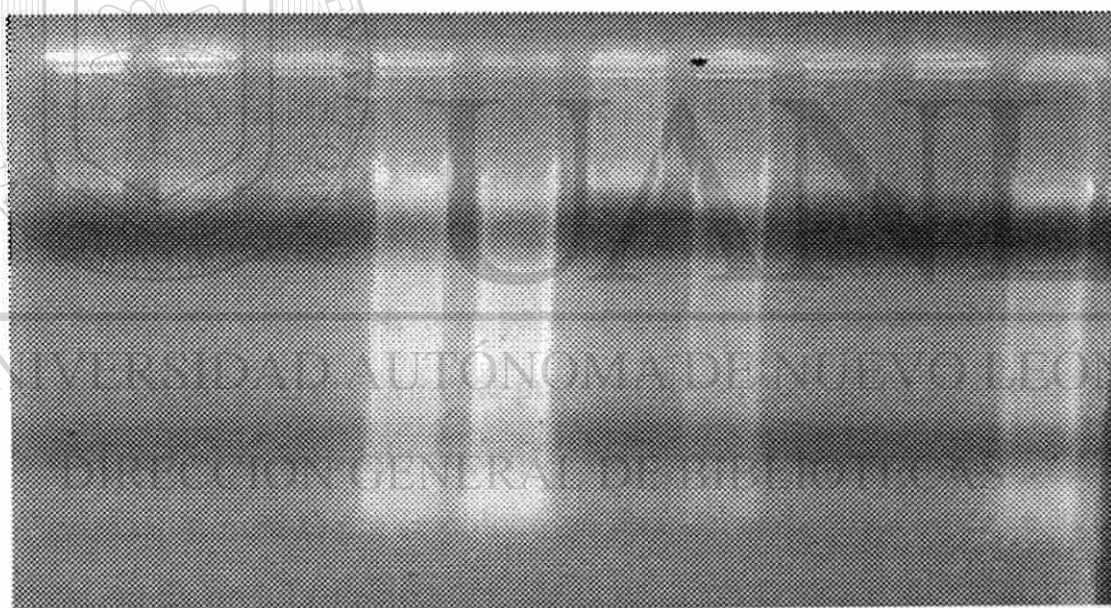


Figura 9. Corrimiento electroforético del DNA de mononucleares bovinos.

4.6.3. Dot Blot (Detección de Provirus del VLB).

El procedimiento empleado para detectar el provirus del VLB en el DNA de los MSP cultivados durante 48 horas fue el recomendado por el fabricante del

juego comercial "SulfoPROBE", el cual emplea un sistema no radiactivo para detectar sondas de DNA químicamente modificadas.

El plásmido pUC-BLV, previamente clonado, se ajustó a una concentración de 0.5mg/ml. Se calentaron 50 μ l a 100°C durante 10 m. en un tubo eppendorf , después se enfriaron rápidamente en hielo y se mezclaron con 25 μ l de la primer solución de modificación, después al tubo se le agregó 6.25 μ l de la segunda reacción de modificación se mezcló en un vortex y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche, después se almacenó a -20°C antes de usarse. Se empleó DNA de espermatozoos de salmón como control llevándose a cabo la misma reacción de modificación.

El DNA de los MSP se diluyó en agua bidestilada hasta una concentración de 1 μ g/ml, se calentó a 100°C durante 5 m y después se enfrió rápidamente en hielo durante 5 m. para finalmente agregar 100 μ l de SSC y agitar brevemente antes de aplicar la totalidad de la muestra en la membrana de nitrocelulosa. Con la ayuda del aparato de "DOT"(BioDot) y de vacío el DNA fue colocado en compartimientos separados y una vez depositada la última muestra se siguió aplicando vacío por espacio de 3 m para después extraer la membrana, secarla a 37°C durante 20 m y posteriormente protegerla en papel filtro y colocarla en una estufa a 80°C a 15 Lbs de vacío durante 2 h.

Después, la membrana se colocó en una bolsa de plástico se le agregó 0.2 ml de solución de prehibridación por cada cm^2 y procurando eliminar burbujas se incubó durante 2 horas a 42°C , pasado este tiempo la bolsa se abrió y se le vació la sonda marcada (5 μ g/ml de solución de DNA modificado) para incubarse durante toda la noche a temperatura ambiente.

La membrana se colocó en una bolsa de plástico, sellable con calor, y se le agregó 50 μ l de buffer de bloqueo por cada de membrana. La bolsa se selló y se incubó con agitación constante durante 1 h. a temperatura de cuarto.

Paralelo a lo anterior, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-DNA modificado se diluyó 1:300 en buffer de bloqueo y una vez terminado el tiempo de incubación anterior se descartó el buffer de bloqueo y se le agregó la dilución anticuerpo anti-DNA, se reselló la bolsa y se repitió la incubación en las mismas condiciones, después, la membrana se enjuagó tres veces con buffer 1 de lavado (15 m por lavado con 3 ml/cm por cada lavado). Una vez lavada, la membrana se depositó en una bolsa de plástico nueva y se le aplicó el conjugado anti-IgG de ratón con fosfatasa alcalina diluido 1:300 en buffer de bloqueo (50µl por cada cm² de membrana) incubándose con agitación constante durante 1 h. a temperatura ambiente. Después de esta etapa de incubación, la membrana se lavó tres veces con buffer 1 de lavado (20 m por lavado) y 2 veces con buffer 2 de lavado (10 m por lavado).

Se colocó la membrana en un papel filtro durante dos minutos con el lado de la reacción hacia arriba y mientras tanto se preparó la solución substrato cromogénica (0.3mg/ml de azul de tetrazolio, 0.2mg/ml 5-Bromo-4-cloro-3-Indol fosfato, en buffer de reacción).

— La membrana se depositó en una bolsa de plástico nueva, se agregaron 5 ml de la solución cromogénica recién preparada, se cerró la bolsa y se incubó a temperatura ambiente durante 50 minutos en la oscuridad.

La reacción se detuvo al depositar la membrana en un contenedor con agua destilada.

4.7. Microscopía electrónica de linfocitos cultivados de vacas seropositivas al VLB.

Para evidenciar la presencia de viriones del Virus de la Leucosis Bovina, se realizó microscopía electrónica de transmisión a MSP, cultivados durante 48 h., procedentes de dos vacas seropositivas al VLB.

Los MSP se extrajeron del cultivo y se centrifugaron a 2500 rpm durante 30 minutos, se desechó el sobrenadante y al paquete celular se le adicionó PBS estéril para efectuar el lavado y eliminar restos celulares, esta operación se repitió 4 veces. Los mononucleares se fijaron en glutaraldehído al 2.5%, en PBS al 0.1M, pH 7.3-7.4 durante toda la noche, se lavaron en buffer de fosfatos dos veces y posteriormente se depositaron en una solución de tetraóxido de osmio al 1% durante 1 hora a 4°C. Los mononucleares se lavaron 3 veces con PBS y se deshidrataron con etanol al 60%, 70%, 80%, 90% y 100% durante 15 minutos cada concentración y posteriormente en óxido de propileno dos veces durante 15 minutos. Se realizó la preinclusión en óxido de propileno-resina plástica (Medcast) a razón de 3:1 durante 3 horas y 1:1 durante 12 h. La inclusión se realizó en la resina en moldes planos y se permitió la polimerización a 65°C durante 48 h. Finalmente se realizaron cortes semifinos y después cortes finos para después observarse en el microscopio electrónico (Zeiss 109) y fotografiarse posteriormente.

4.7. Obtención de datos y Análisis estadístico.

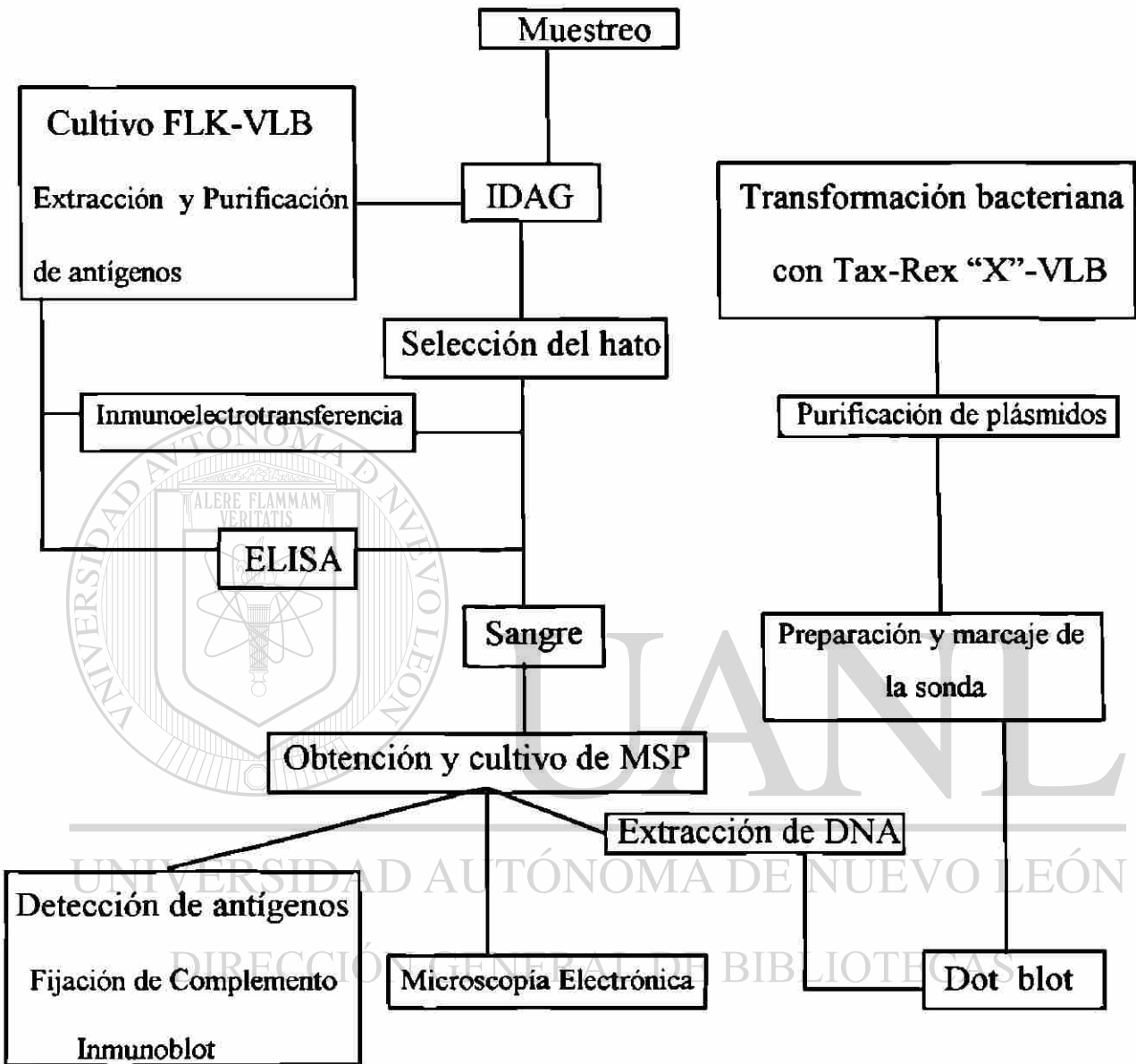
—Para el análisis epizootiológico se registraron los datos de la raza, edad, sexo, función zootécnica y procedencia de cada uno de los animales; mientras que para el análisis comparativo entre las técnicas de IDAG, ELISA e Inmunoelctrotransferencia se registraron los datos de grado de seropositividad a IDAG y reactividad a cada una de las pruebas.

Las tasas de seroprevalencia se determinaron mediante la fórmula:

$$P = \text{No. de seropositivos} / \text{No Total} \times 100.$$

Se aplicó la prueba de Ji-cuadrada (100) para determinar la asociación entre la seropositividad con la función zootécnica y con la raza.

4.8. Diagrama de Flujo



5. RESULTADOS

5.1. Total de muestras, tipo de producción y procedencia.

Se obtuvieron un total de 2638 muestras, de las cuales el 51.2% (1353/2638) correspondió al ganado productor de leche y el 48.7% (1285/2638) a productores de carne (Cuadro I y II).

El total de los municipios de los cuales procedían los animales fueron 23, perteneciendo 14 de éstos al estado de Nuevo León, 5 al estado de Coahuila y 3 al de Tamaulipas (Cuadro II).

5.1.1. Edad y razas de los animales.

Se encontró que los rangos y promedios de edad de los animales varían de acuerdo por tipo de producción, observándose para los destinados a la producción de carne un rango de 1 a 6 años con promedio relativamente bajo de 2.5, mientras que para los productores de leche el rango fue mayor con 1 a 12 años y un promedio de 7.4 años.

El total de razas observadas al muestreo fueron 9 (un grupo de 35 animales no se identificaron), resultando frecuencias mayores en la Holstein con 1305 (49.5%) y las cruzas de Cebú con 690 (26.1%), el resto de las razas tuvieron frecuencias bajas (Cuadro V).

5.2. Seropositividad y prevalencia.

La seroprevalencia general determinada en el presente estudio fue de 20.8% (548/2638) (Cuadro II).

La distribución de los animales seropositivos de acuerdo al municipio de procedencia se observa en el Cuadro I. Los municipios con mayor porcentaje de bovinos productores de leche seropositivos fueron: Pesquería, N.L. (65.2%, 73/112), Marín, N.L. (55.2%, 58/105), Torreón, Coah. (49.6%, 62/125), Galeana, N.L. (46.4%, 89/192), Escobedo, N.L. 38.3%, 161/4420) y Saltillo, Coah.

(31.2%, 54/173); mientras que en bovinos productores de carne, que resultaron con bajos porcentajes, se encontraron positivos en Montemorelos, N.L. (2.4%, 3/127) y Anáhuac, N.L.(2.1, 2/97), entre otros.

De acuerdo al tipo de explotación se observó una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) dado que 539 bovinos productores de leche resultaron positivos obteniéndose un 39.8% de seroprevalencia en este grupo, mientras que para los productores de carne se registraron 9 positivos estimándose para ellos una seroprevalencia de 0.7% (Cuadro I y II).

Cuadro I. Localización, tipo de producción y seropositividad de los hatos muestreados en el noreste de México para detectar al Virus de la Leucosis Bovina (VLB).

Estado	Municipio	Muestras		Positivos (%)		Total analizados
		BpC	BpL	BpC	BpL	
Nuevo León	Galeana	16	192	0 (0)	89 (46.4)	208
	Pesquería	0	112	0 (0)	73 (65.2)	112
	Marín	22	105	0 (0)	58 (55.2)	127
	Anáhuac	97	0	2 (2.1)	0 (0)	97
	Linares	65	0	1 (1.5)	0 (0)	65
	China	83	0	1 (1.2)	0 (0)	83
	Gral. Bravo	61	0	0 (0)	0 (0)	61
	Cadereyta	56	37	0 (0)	6 (16.2)	93
	V. Santiago	0	43	0 (0)	13 (30.2)	43
	Escobedo	16	420	0 (0)	161 (38.3)	436
	Montemorelos	127	10	3 (2.4)	0 (0)	137
	Allende	84	0	1 (1.2)	0 (0)	84
	Agualeguas	43	0	0 (0)	0 (0)	43
Apodaca	48	88	0 (0)	23 (26.1)	136	
Coahuila	Saltillo	0	173	0 (0)	54 (31.2)	173
	Torreón	0	125	0 (0)	62 (49.6)	125
	Gral. Cepeda	0	48	0 (0)	0 (0)	48
	Piedras Negras	93	0	0 (0)	0 (0)	93
	Nueva Rosita	106	0	1 (0.9)	0 (0)	106
Tamaulipas	Soto la Marina	250	0	0 (0)	0 (0)	250
	Cd. Mier	63	0	0 (0)	0 (0)	63
	Cd. Victoria	55	0	0 (0)	0 (0)	55
Total		1285	1353	9 (0.7)	539 (39.8)	2638

Cuadro II. Seropositividad contra el Virus de la Leucosis Bovina en bovinos del Noreste de México, de acuerdo a la función zootécnica.

Función zootécnica	Muestreado	% del	Positivos	Seropositividad (%)
Producción de carne	1285	48.7	9	0.7
Producción de leche	1353	51.3	539	39.8
Total	2638	100.0	548	20.8

La seropositividad de acuerdo a la edad, determinada en 638 bovinos destinados a la producción de leche, se observa en el Cuadro IV, se aprecia que todos los intervalos de edades resultaron positivos, sin embargo, los porcentajes más altos se observaron en las edades de 6 a 8 y 2 a 4 años con 36.5% (19/52) y 17.5% (45/263), respectivamente.

Por otra parte, de los 9 BpC seropositivos 8 resultaron con edad aproximadas de 6 años y solamente 1 con 2 años.

Cuadro III. Seropositividad contra el VLB en bovinos de diferentes edades de algunos hatos lecheros del noreste de México.

Edad	Analizados	Positivos	% Seroprevalencia
1-2	105	4	3.8
2-4	263	45	17.5
4-6	185	8	4.3
6-8	52	19	36.5
8 o más	33	3	9.0

5.2 Con respecto a la raza del animal o sus cruzas (Cuadro IV), las razas muestreadas de los bovinos productores de leche fueron la Holstein y la Jersey reaccionando únicamente la primera con 539 de 1305 animales (41.3% de seroprevalencia para esta raza) en tanto que para las razas destinadas a producir carne, las que resultaron mayormente afectadas en base al porcentaje de seropositividad fueron la Beefmaster con 3.26 (3/92), la Santa Gertrudis con 1.67% (2/120) y las cruzas de Cebú con 0.58% (4/690), el resto de las razas permanecieron negativas a la prueba de inmunodifusión.

De las razas estudiadas, la Holstein tiene una mayor predisposición a la seropositividad contra VLB y ésta es altamente significativa cuando se compara con otras razas que también resultaron seropositivas ($p < 0.01$).

Cuadro IV. Distribución de bovinos seropositivos al Virus de la Leucosis Bovina acuerdo a la raza y función zootécnica.

Raza	Función Zootécnica	No.	%	Positivos			
				No	% Raza	% Prod	% Total
Cebú	BpC	690	26.1	4	0.58	0.31	0.15
Sta. Gertrudis	BpC	120	4.5	2	1.67	0.16	0.08
Beefmaster	BpC	92	3.5	3	3.26	0.23	0.11
Charolais	BpC	117	4.4	0	0	0	0
Simmental	BpC	78	3.0	0	0	0	0
Hereford	BpC	64	2.4	0	0	0	0
Pardo Suizo	BpC	89	3.4	0	0	0	0
Criollo	BpC	35	1.3	0	0	0	0
Holstein	BpL	1305	49.5	539	41.3	39.8	20.4
Jersey	BpL	48	1.8	0	0	0	0
Total		2638		548			20.8

5.3. Comparación entre ELISA, Western blot e IDAG para detectar anticuerpos contra VLB en hatos con diferente seroprevalencia.

La sensibilidad para detectar anticuerpos anti-VLB se comparó en tres hatos con elevada, baja y nula seropositividad determinada con IDAG.

Las metodologías Inmunoenzimáticas, resultaron más sensibles puesto que IDAG sólo detectó el 55% de positivos del hato con alta seroprevalencia, mientras que ELISA y Western blot detectaron el 72.5% y 77.9% respectivamente, así mismo, en el hato considerado con baja seroprevalencia, IDAG detectó 12.1% de seropositividad pero ELISA y Western Blot 27.3% y 21.2% respectivamente. Por otra parte, de un hato de BpC seronegativo en IDAG, un suero reaccionó tanto a ELISA como en Western blot resultando para este hato 5.5% de seropositividad (Cuadro VII).

Los tres métodos concordaron en el 75% (22 positivos y 8 negativos) de los 40 sueros analizados del hato con elevada seroprevalencia, no obstante en el mismo hato las pruebas inmunoenzimáticas concordaron en un 90% (28 positivas y 8 negativas).

En el hato con baja seroprevalencia, las técnicas serológicas empleadas concordaron en un 84.8% (24 negativos y 4 positivos) de los 33 sueros analizados, mientras que considerando únicamente a las pruebas inmunoenzimáticas, éstas concordaron en un 93.9% (24 negativos y 7 positivos).

Cuadro V. Comparación entre ELISA, Western Blot e IDAG para detectar anticuerpos séricos contra VLB en tres hatos bovinos con diferentes seroprevalencias.

Función Zootécnica	Analizados	ELISA		Western blot		IDAG	
		+	%	+	%	+	%
Prod. Leche (A)	40	29	72.5	31	77.9	22	55
Prod. Leche (B)	33	9	27.3	7	21.1	4	12.1
Prod. Carne	18	1	5.5	1	5.5	0	0
Total	91	39	42.9	39	42.9	26	28.6

5.4. Detección de antígenos del VLB en MSP.

A partir del extracto protéico obtenido de los MSP cultivados se obtuvieron diferentes patrones de reactividad contra VLB en el Westernblot .

En la figura 8 se muestran algunas reacciones contra las proteínas estructurales Gp₅₁, P₂₄, además de otras proteínas con PM similar a las proteínas Gp₃₀, P₁₅, P₁₀₋₁₂ y una banda de precipitación arriba de PM 51 (probablemente esta última corresponde al producto de traducción del gen gag Pr70^{gag}).

Por otra parte, los antígenos del VLB también se evidenciaron con la prueba de fijación de complemento. Para obtener las diluciones óptimas de trabajo, primero se determinaron la densidades ópticas del extracto protéico del sobrenadante del cultivo de MSP diluido 1:50 y 1:100 contra diluciones 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 de un suero de bovino fuertemente seropositivo a IDAG.

Los valores de estas densidades se presentan en el Cuadro VIII, así mismo la curva de absorbancia obtenida con las diferentes diluciones se muestra en la Figura 10. Los valores de densidad óptica en las diluciones 1:50 y 1:100 resultaron similares, sin embargo, se escogió la primera dilución para determinar la presencia de antígenos del VLB.

Cuadro VI. Densidad óptica obtenida en la prueba de fijación de complemento para la detección de antígenos del VLB en cultivo de MSP de vacas positivas a IDAG.

Muestra	Dilución de antígeno	Dilución del suero (+)			
		1:8	1:16	1:32	1:64
FLK-VLB	1:50	0.018	0.26	0.26	0.272
	1:100	0.017	0.125	0.261	0.281
Paloma	1:50	0.020	0.051	0.271	0.271
	1:100	0.011	0.112	0.271	0.271
242	1:50	0.011	0.021	0.18	0.23
	1:100	0.01	0.021	0.214	0.25

Control anticomplementario = 0.292
242 s/antígeno (control) = 0.302

FLK-VLB control 1:50 = 0.309 Paloma s/antígeno (control) = 0.309
Eritrocitos lisados (Control s/antígeno y s/ anticuerpos). = 0.28

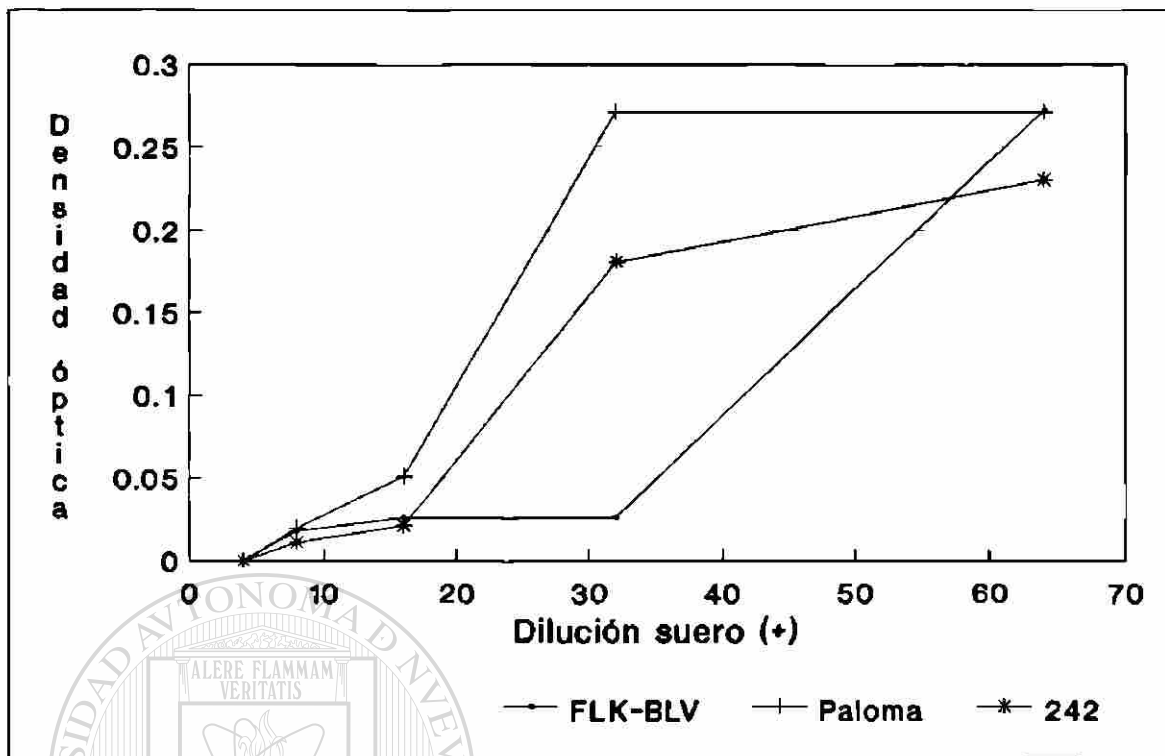


Figura 10. Absorbancia obtenida con el sobrenadante de cultivo de linfocitos en la prueba de fijación de complemento.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.5. Comparación entre Western blot y FC para la detección de antígenos del VLB en cultivos de MSP.

Al comparar la concordancia en los resultados de las pruebas de Westernblot y Fijación de Complemento para detectar antígenos en un hato, ésta resultó en un 100%, sin embargo con el Westernblot fue posible distinguir que los animales de un mismo hato presentan diferentes reacciones de seropositividad contra antígenos estructurales del VLB (Cuadro IX).

Cuadro VII. Comparación entre el Westerblot y Fijación de Complemento para la detección de antígenos del VLB en linfocitos de vacas positivas o negativas a IDAG.

No.	Reacción a IDAG *		Proteína reactiva	Detección de Antígeno	
	1a	2a		FC / D.O.	W.B.
263	+	+	p24	+/0.018	+
605	+	+	p24	+0.021	+
717	+	-	-	-/0.28	-
734	+	+	p24, Gp51	+/0.015	+
800	+	+	p24, Gp51	+/0.011	+
836	+	+	p24	+/0.028	+
853	+	+	p24	+/0.023	+
860	+	+	p24	+/0.018	+
878	-	-	-	-/0.26	-
896	-	-	-	-/0.30	-
1065	-	-	-	-/0.30	-
1049	-	-	-	-/0.28	-
1072	-	-	-	-/0.27	-
1076	-	+	Gp51	+/0.023	+
1079	-	-	-	-/0.26	-

* La IDAG se realizó con intervalo de 6 meses. / FC.= Fijación de Complemento
D.O.= Densidad Optica. / WB= Westernblot

5.6. Detección del provirus del VLB en DNA de MSP cultivados y comparación con las pruebas serológicas para detectar la infección por VLB.

La presencia del provirus del VLB en el ADN de MSP cultivados se determinó por una prueba de hibridación "Dot blot" utilizando como "sonda" el segmento genético Tax, Rex, "X" del VLB (Figura 7) portado en un plásmido (pGEM3-Tax,Rex,"X"-VLB).

Cuadro VIII. Comparación entre ELISA, Dot blot é IDAG para detectar la infección Virus de la Leucosis Bovina (VLB) en un hato lechero con elevada seroprevalencia.

Número de muestras analizadas	IDAG		ELISA		Dot blot	
	+	%	+	%	+	%
50	29	58	36	72	38	76

5.7. Detección de Viriones del VLB.

Se detectaron partículas virales Tipo “C” en MSP, cultivados durante 48 horas, de vacas seropositivas al VLB. Las partículas fueron escasas y se encontraron tanto dentro de vesículas en el citoplasma como adheridas a la membrana de los mononucleares. Cada partícula viral estuvo compuesta de un “nucleoide” central rodeado por una membrana claramente definida (Figura 12).

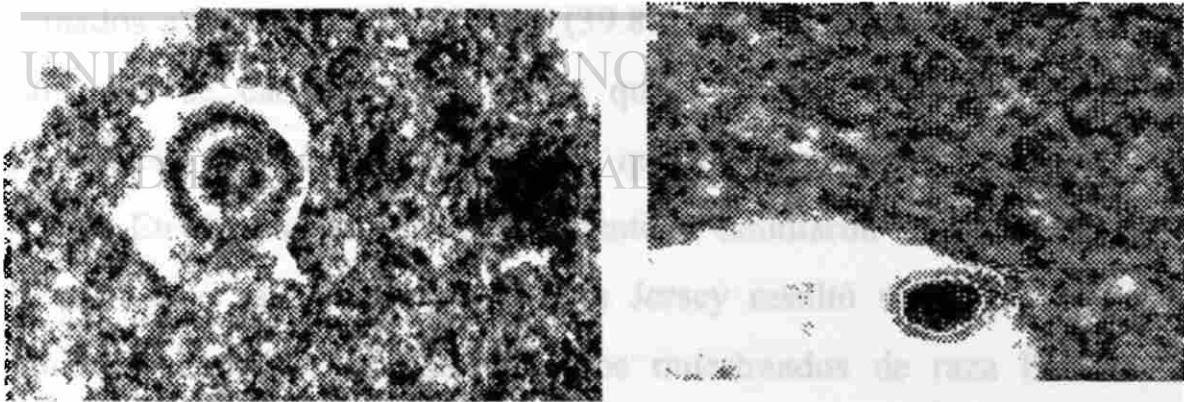


Figura 12. Partículas virales tipo “C” observadas en mononucleares sanguíneos, estimulados con Concanavalina A, obtenidos a partir de vacas seropositivas al VLB.

6. DISCUSIÓN

En otros países la prevalencia de la infección por el Virus de la Leucosis Bovina en bovinos está ampliamente documentada (17,23,37,53,61,67,78, 108,120), sin embargo los estudios a nivel nacional son escasos y solamente se han realizado este tipo de investigaciones en ciertas zonas (8,34,60, 70,91,121,125,137) por lo que la epizootiología del Virus de la Leucosis Bovina Enzoótica en México se conoce pobremente.

La seroprevalencia general de 20.8% obtenida en el presente trabajo es más alta a la reportada anteriormente por nosotros Trejo y col. y Avalos y col. en la misma zona (8,125).

Se determinó que de acuerdo al tipo de explotación existe una mayor prevalencia de anticuerpos altamente significativa ($p < 0.01$) en los bovinos productores de leche. Al respecto, se ha indicado que existen algunos factores de riesgo que influyen en esta observación entre los que destacan el manejo, predisposición genética, tamaño del hato, época del año y edad del animal (55,56,61,63), de esta manera la alta seroprevalencia observada en los bovinos destinados a la producción lechera (39.8%) comparada con los destinados a la producción de carne (0.7%), refleja que los primeros son más propensos a adquirir esta infección, observación que se ha documentado anteriormente (17,40). En el presente trabajo, solamente se estudiaron dos razas de BpL, de las cuales el hato muestreado de la raza Jersey resultó seronegativo (Cadro V), mientras que todos los hatos bovinos muestreados de raza Holstein fueron seropositivos; este resultado tal vez esté influenciado por el relativo “aislamiento” de los bovinos Jersey analizados en este estudio, dado que este hato en particular ha permanecido 7 años cerrado a la introducción de BpL de otras fuentes, mientras que en el caso de los hatos con bovinos Holstein, el intercambio de ganado de una explotación a otra es una práctica común en la zona y además el manejo empleado prácticamente en todos estos hatos del área

permite la continua transmisión del virus entre los animales. Lo anterior contrasta con las observaciones realizadas por Burridge y col. quienes determinaron una prevalencia de anticuerpos, altamente significativa ($p < 0.0001$), contra VLB en bovinos de raza Jersey que en otras razas lecheras (Holstein, Guersey y Pardo Suizo) de Florida U.S.A. (17).

En los bovinos productores de carne (BpC) la seroprevalencia serológica fue de 0.7% y por razas solamente 3 (Cebú 0.15%, Beefmaster 0.11% y Santa Gertrudis 0.08%) de las 8 muestreadas resultaron seropositivas, estos resultados concuerdan con la mayoría de los estudios seroepizootiológicos realizados en otras partes del mundo (10,19,23,37,53,61,67, 108,120), con excepción de los datos obtenidos por Marín y col. quienes encontraron en 14 razas de BpC frecuencias serológicas muy altas de 11% hasta 100%. En E.U.A. y otras regiones de México también se ha reportado alta frecuencia serológica contra VLB en BpC (17,71,92).

Con excepción del hato muestreado de Galeana N.L., los hatos lecheros con mayor índice de seropositivos se encontraron ubicados cerca de zonas urbanas relativamente grandes (Cuadro VI), esto concuerda con lo reportado por Zapata y cols. (137). Esta frecuencia se debe tal vez al intercambio de bovinos entre estos productores, a la similitud de manejo en estas áreas o a la introducción de ganado infectado procedentes de otras áreas, no obstante, es necesario destacar esta tendencia de la alta seroprevalencia contra VLB (16.2 - 65.2%) en zonas con alta densidad de población humana.

Con respecto a la seropositividad (en los hatos en los cuales se encontró al menos un animal positivo) observada en los bovinos productores de carne indican que las condiciones de manejo en estos hatos favorecen la transmisión de linfocitos que portan el provirus del VLB, no obstante la baja seropositividad observada tal vez esté relacionada con el período de vida de estos animales ya que éstos son enviados al sacrificio más tempranamente que los BpL.

Anteriormente se ha establecido que en BpL mayores de seis meses de edad la prevalencia de anticuerpos anti-VLB incrementa conforme aumenta la edad (17,37,100). De acuerdo a los resultados en el Cuadro IV, la alta seroprevalencia de VLB en bovinos con edades entre 6 a 8 años de edad, está de acuerdo con observaciones realizadas por Brenner y col. en 1989, quienes encontraron un decremento en la población de bovinos lecheros con esta edad en varios hatos seropositivos, este hallazgo está relacionado con la baja productividad en este grupo de animales, de tal manera que el productor decide enviarlos al rastro (12), así mismo, Thurmond y col. demostraron que cuando una vaca resulta seropositiva tiene una probabilidad mayor a ser desechada, encontrando a la mayoría de estos animales en edades de 5.5 a 6.5 años (123).

Los estudios epidemiológicos, realizados en diversas partes del mundo, se han favorecido por la fuerte respuesta serológica persistente contra VLB por los animales portadores (5,18,30,41,50,61,94,122) y debido a esta característica se han llevado a cabo diversos estudios para determinar la sensibilidad y especificidad de algunas pruebas serológicas (9,18,42,43,46,49,51,54,83,86,91), dentro de las más sobresalientes han destacado la Prueba de Radioinmunoensayo (41,51,83), ELISA (14,46,68,96,109) e Inmunoelectrotransferencia (50,76), no obstante, tales pruebas son costosas y algo laboriosas por lo que para situaciones de campo en las que se requiera identificar hatos o grupos de animales portadores del VLB la IDAG continua siendo ampliamente usada (85,90). Inclusive hasta la fecha es la única prueba serológica aceptada oficialmente por la Oficina Internacional de Epizootias y por la Comunidad Económica Europea para el movimiento de animales de un país a otro (54). En el presente trabajo, empleando la prueba de IDAG, se seleccionaron arbitrariamente tres hatos en base al índice de seropositividad contra el VLB (elevada, baja y nula seroprevalencia) en cada uno de ellos (Cuadro VII); el procedimiento de IDAG resultó menos sensible que las técnicas de ELISA e Inmunoelectrotransferencia

(55% vs 72.5% y 77.9%, respectivamente) (Cuadro VII), similarmente fue menos efectiva para encontrar animales infectados cuando se comparó con las pruebas de ELISA y Dot blot en un hato con elevada seroprevalencia (Cuadro X). No obstante, la utilidad de IDAG se ha demostrado previamente en estudios epizootiológicos y de control. Monke y col. (91) estimaron una sensibilidad de 98.5% de esta técnica al analizar 1296 muestras, y además, se ha demostrado la eficiencia de la IDAG para erradicar y controlar al VLB en hatos lecheros con altos índices de infección (76,118).

Por lo que IDAG puede emplearse exitosamente en este tipo de estudios, dado que para detectar hatos infectados o segregar animales seropositivos, esta técnica puede resultar más práctica, sencilla de interpretar y de fácil ejecución. Sin embargo, de acuerdo a los datos obtenidos en el presente trabajo, en aquellos casos en los cuales sea necesario detectar específicamente qué animales están infectados o cuando los animales posean títulos bajos de anticuerpos, esta prueba puede subestimar la seroprevalencia dada la baja sensibilidad con respecto a ELISA, Inmunoelctrotransferencia y Dot blot.

— Otros investigadores han utilizado la técnica de ELISA para detectar anticuerpos anti-VLB (9,14,46,49), el presente trabajo, con respecto a los anteriores, presenta variaciones menores en los parámetros de tiempos de incubación (tanto para la adhesión del antígeno a la placa de poliestireno como en la reacción antígeno-anticuerpo), dilución del suero sospechoso, bloqueador y en el empleo de conjugado anti-IgG de bovino marcado con fosfatasa, en lugar de peroxidasa. A pesar de esto, los valores de sensibilidad y concordancia obtenidos, al compararse con IDAG, no fueron diferentes en gran medida con los valores observados previamente por estos autores.

Con la técnica de ELISA, al igual que otros procedimientos serológicos, la probabilidad de diagnosticar correctamente a animales con infecciones virales depende de las propiedades del antígeno empleado (concentración, pureza y

antigenicidad) (14,46) y de las características de la respuesta serológica contra el virus (38,69). En el presente trabajo se pretendió detectar anticuerpos anti-Gp₅₁ dado que existe una fuerte respuesta serológica contra este antígeno y además se ha demostrado anteriormente que el hallazgo de estos anticuerpos es un buen indicador de la infección por VLB (69,97). De hecho, la prueba de ELISA y Dot blot al compararse para detectar el porcentaje de infección en un hato con elevada seroprevalencia, presentaron valores muy similares de 72 y 76% respectivamente (Tabla X).

El procedimiento empleado para purificar la Gp₅₁ del VLB se ha empleado con éxito por otros investigadores (49,84), además, este antígeno una vez purificado reaccionó fuertemente en IDAG contra antisueros control específico contra VLB (Proporcionado por el Dr. Van Der Maaten, Ames Iowa) y previamente se ha reportado que los valores de absorbancia generados por este antígeno en la prueba de ELISA son superiores que cuando se usa en combinación con otros antígenos del VLB (49).

Por otra parte, se ha determinado que las FLK-VLB están contaminadas con el Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB), (comunicación personal del Van Der Maaten, Ames Iowa) por lo que éste es otro factor que se debe de tomar en cuenta al obtener la Gp₅₁ de las FLK-VLB, en este trabajo se comprobó la pureza de la Gp₅₁ mediante electroforesis y la confrontación de este antígeno contra antisueros específicos contra VLB y VDVB, así que la posibilidad de contaminación con proteínas del VDVB, con este procedimiento es nula y es muy baja la probabilidad de que los resultados ELISA-positivos lo sean por detectar anticuerpos anti-VDVB.

La mayor sensibilidad de las pruebas inmunoenzimáticas para detectar animales con anticuerpos contra VLB comparadas con la IDAG, pudo deberse a que estas pruebas tal vez detectaron algunas subclases de Inmunoglobulina G, las cuales no precipitaron en el gel de la IDAG, esta observación se apoya en el

reporte de Nguyen y Mes (97) quienes encontraron vacas con signos clínicos de infección por VLB positivas con ELISA que resultaron seronegativas a IDAG. Situación, que similarmente fue observada en el presente estudio al comparar la eficacia de IDAG, ELISA y Dot Blot, un hato con elevada seroprevalencia (Cuadro X) y a la comparación de las pruebas serológicas (IDAG, ELISA e Inmunoelectrotransferencia) para detectar la infección en hatos con diferente seroprevalencia (Cuadro VII).

Las pruebas inmunoenzimáticas presentaron una concordancia general del 100% (Cuadro VIII), no obstante se encontraron discrepancias en tres sueros de cada hato lechero analizado (sueros 11,17 y 38 del hato con alta seroprevalencia, Tabla 1 de Apéndice; y sueros 10,16 y 29 del hato con baja seroprevalencia, Tabla 2 de Apéndice) y éstas pudieron ocasionarse tal vez a errores en el proceso de ambas técnicas o a fallas en la interpretación de cada prueba.

No obstante lo anterior, ELISA puede llegar a establecerse como una prueba rutinaria para diagnosticar la infección por VLB, dado que los resultados se producen en menor tiempo que IDAG e Inmunoelectrotransferencia, se pueden cuantificar e interpretar fácilmente (una vez estandarizada) y además una vez sensibilizadas las placas (ver material y métodos) se pueden almacenar por un período razonable sin pérdida de la actividad antigénica de la Gp₅₁ y se puede adaptar esta técnica para detectar anticuerpos presentes en leche o calostro de animales dado que es una prueba más sensible que IDAG (69,97).

Walker y col. describieron un procedimiento de Inmunoelectrotransferencia para detectar anticuerpos anti-p₂₄ en ganado bovino y ovino infectado experimentalmente con el virus de la leucosis bovina mientras que Grover y Guilleman describieron el proceso por el mismo método para detectar simultáneamente anticuerpos anti-p₂₄ y anti-Gp₅₁, en muestras de suero provenientes de animales infectados con VLB con diferentes condiciones clínicas (Linfosarcoma adulto, Linfocitosis persistente, leucémicos y aleucémicos). En

ambos estudios el IET demostró más especificidad y sensibilidad al compararse con las metodologías de ELISA e IDAG. En el presente trabajo, con los resultados de la seropositividad a IDAG se seleccionaron tres hatos con diferentes grados de seroprevalencia contra VLB, observándose que las pruebas inmunoenzimáticas ELISA e IET, al considerar el total de la población estudiada, detectaron el mismo porcentaje general de muestras positivas y fueron más sensibles que IDAG (Cuadro VII). No obstante, en el hato con alta seropositividad a IDAG (22/40, 55%, hato A), la Inmunolectrotransferencia detectó el 77.9% (31/40) de las muestras, mientras que ELISA detectó el 72.5% (29/40) de los estudiados, esta situación no fue igual en el hato con baja seropositividad (12.1%, 4/33; IDAG, hato B) dado que IET detectó como positivos al 21.1% (7/33) y ELISA al 27.3% (9/33) de las muestras, (Cuadro VII y Tabla 1 y 2 de Apéndice). Un estudio previo realizado por Zanoni y col. compararon la sensibilidad de ELISA e IET para detectar anticuerpos contra el virus de Artritis Encefalitis Caprina y determinaron que todas las muestras positivas por ELISA también lo fueron por IET y además un grupo de muestras con resultados dudosos en ELISA fueron claramente resueltos por IET.

Las discrepancias observadas en nuestro estudio, tal vez se deban en parte a que las lecturas de Densidad Óptica en la prueba de ELISA, particularmente en las muestras 11, 12, 17 y 38 del hato A y las muestras 10, 16 y 29 del hato B, se encontraron cercanas al punto de corte (0.2 D.O.) y probablemente este se encuentre subestimado. O bien que la menor estabilidad de la enzima fosfatasa utilizada para ELISA con respecto a la peroxidasa empleada para IET influya en estos resultados.

Por lo que tomando en cuenta lo anterior es evidente que nuestro estudio confirma los resultados que indican que IET es más sensible que otras pruebas rutinarias, particularmente IDAG, empleadas para el diagnóstico de VLB, además

con IET se determina específicamente contra cuál (es) antígeno (s) reacciona (n) el (los) anticuerpo (s).

Los viriones y antígenos del VLB no pueden ser demostrados en linfocitos de vacas seropositivas a menos que éstos sean cultivados y de hecho la expresión "in vitro" del VLB se puede detectar a las tres horas de incubación pero tienen su máxima producción a las 18-24 horas (25). La detección de antígenos del VLB a partir de linfocitos cultivados se ha realizado por varios grupos de investigadores en otros países, con el propósito de correlacionar el nivel de expresión del virus con el número de linfocitos infectados (y así la infectividad de un animal), en nuestro trabajo se empleó esta metodología y la de fijación de complemento para demostrar la presencia de antígenos en sobrenadante de cultivo de linfocitos en animales con serología positiva o negativa, como se demuestra en el Cuadro IX, hubo una correlación de 100% entre estas dos pruebas para detectar los antígenos del Virus, no obstante con la IET fue posible distinguir serorreacciones contra diferentes proteínas estructurales y no estructurales (Figura 8). La detección de antígenos del VLB en cultivo de Mononucleares se ha llevado a cabo por diferentes pruebas serológicas como Inmunofluorescencia, Inmunodifusión e Inmunodifusión radial (25,70), sin embargo, estas pruebas (como se observa con la Prueba de Fijación de Complemento realizada en el presente estudio) no detectan qué o cuáles proteínas virales son expresadas por el VLB como fue posible resolver con la IET. En estudios subsecuentes de infectividad la metodología de FC, tal vez nos puede permitir la detección de vacas con MSP con altos niveles de expresión in vitro, y mediante ello favorecer la detección temprana de animales "altamente infecciosos" para separarlos del hato, independientemente de su serológico contra VLB, y evitar la difusión del VLB. No obstante, como es observado aquí sería necesario la confirmación de la infección con IET. Anteriormente Weber y col (116) propusieron que la detección de viriones y/o antígenos virales en cultivos de linfocitos formen la

base para desechar animales "altamente infecciosos". No obstante es importante conocer si existen diferencias en los niveles de MSP infectados en los diferentes estados fisiológicos en los cuales se encuentran las vacas en un hato lechero.

La prueba de Dot blot fue más sensible que las pruebas serológicas IDAG y ELISA para detectar la infección por VLB en un 61.4% y 5.2% respectivamente y se detectó el provirus en el 100% de los animales seropositivos, estos resultados nos indican que un alto número de animales con serología negativa por IDAG están infectados con el virus. Las pruebas serológicas son una buena herramienta para detectar hatos infectados con VLB, sin embargo, como es observado en el Cuadro X, éstas no siempre son capaces de determinar la infección en casos individuales, lo anterior es apoyado por estudios en los cuales han determinado que las metodologías serológicas para detectar VLB, particularmente IDAG, no detectan infecciones tempranas; por otro lado, sus resultados dependieron de la concentración de anticuerpos presentes en la muestra. Anteriormente también se ha reportado que los métodos serológicos pueden no detectar anticuerpos anti-VLB en animales coinfectados con el Virus de la Leucosis Bovina y el Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB), probablemente debido al efecto inmunosupresor de este último en animales infectados.

Por otra parte, se ha documentado que hembras de bovinos cercanos al parto presentan un descenso en el título de anticuerpo contra algunas infecciones, incluyendo VLB, por lo que el bajo índice de seropositivos encontrado comparado con el Dot blot, tal vez refleje que estos animales se encontraban en este estado fisiológico.

El alto número de animales detectados como positivos con Dot blot en nuestro estudio contrasta con lo reportado por otros autores (99) quienes empleando Southerblot en MSP no pudieron detectar al provirus en el 50% de la población afectada con VLB.

7. CONCLUSIONES

La seroprevalencia contra el Virus de la Leucosis Bovina (VLB) en Bovinos de la zona noreste de México es de 20.8%.

Los bovinos destinados a la producción de leche resultaron más afectados ($p < 0.01$) con 39.8% (539/1353) que los destinados a la producción de carne (0.7%, 9/1285).

La seroprevalencia por hatos de cada municipio estudiado varió desde 0 hasta 21.7%.

La Prueba de Inmunodifusión en Agar Gel (IDAG) subestima la prevalencia real de la infección por el Virus de la Leucosis Bovina Enzoótica.

Las pruebas Inmunoenzimáticas (ELISA e IET) son más sensibles que la IDAG para detectar serológicamente la infección por VLB.

El provirus (viriones) del Virus de la Leucosis Bovina Enzoótica circula con alta frecuencia en vacas lecheras del Noreste de México.

Los mononucleares sanguíneos periféricos de vacas seropositivas expresan niveles de antígenos del VLB detectables por Fijación de Complemento e Inmunoelectrotransferencia.

En el Noreste de México existen vacas serológicamente (IDAG) negativas pero infectadas con el VLB; lo cual, aunado a las prácticas de manejo y al intercambio de ganado en la zona, mantienen la infección por VLB en esta área.

8. LITERATURA CITADA

- 1.-Abramova, E.N., V.S.Kondratev and I.A. Stinskii (1979). The biochemistry of leucosis in cattle. *The Veterinary Bulletin*. 44:689-704.
- 2.-Agresti, A., W. Ponti, M. Rocchi, R. Marozzi, D. Cavalleri, E. Peri, E Ginelli. (1993). Use of polimerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infections in calves at birth. *Am. J.Vet. Res.* 54:373-378.
- 3.-Aida, Y. M.Onuma, N.Kasai, H.Izawa. (1987). Use of viable-cell ELISA for detection of monoclonal antibodies recognizing tumor-associated antigens on bovine lymphosarcoma. *Am.J.Vet. Res.* 48:1319-1324.
- 4.-Aline, A. y A.Uruchurtu (1969) Linfosarcoma (Leucemia) en Bovinos. *Bol.Col.Nal. de Med. Vet.Zoot.* 3:18-22.
- 5.-Astier, T., R. Mamoun, B. Guilleman, A.L. Parodi and J.F. Duplan. (1978). Characterization of antibodies responsible for the inhibition of blv induced early polycaryocy. *Ann. Rech. Vet.* 9:699-708.
- 6.-Avalos, R.R., P. Zapata, L.Trejo, V. García. (1992). Seroprevalencia del Virus de la Leucosis Bovina (VLB), en bovinos sacrificados en el rastro de Monterrey, N.L. *XVII Congreso Nacional de Buiatria* Cd. Guadalupe, N.L. Oct. de 1992.
- 7.-Ban, J., E. Gieciova, O.Orlik, C. Altaner. (1990). Use of monoclonal antibodies in an ELISA for the diagnosis of bovine leukaemia virus infection. *Journal of Virological Methods.* 30:79-88.
- 8.-Brandon, R.B., H. Naif, R.C.W. Daniel, M.F. Lavin. (1991). Early detection of bovine leukosis virus DNA in infected sheep using the polymerase chain reaction. *Research in Veterinary Science.* 50:89-94.
- 9.-Brenner, J., M. Van Haam, D. Savir and Z. Trainin (1989). The implication of BLV infection in the productivity, reproductive capacity and survival rate of a Dairy Cow. *Vet. Immun. and Inmunopath.* 22: 299-305.

- 10.-Bruck, C. S. Mathot, D. Portetelle, C. Berte, J. Franssen, P. Herion, A. Burny. (1982). Monoclonal antibodies define eight independent antigenic regions on the bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoprotein gp51. *Virology* 122:342-252.
- 11.-Boer, G.F., H.M. Boerrigter, J.P.W.M. Akkermans, J. Brenner. (1989). Use of milk samples and monoclonal antibodies directed against BLV-p24 to identify cattle infected with bovine leukemia virus (BLV). *Vet. Immun. and Immunopath.* 22: 283-292.
- 12.-Burny, A., C. Bruck, Y. Cleuter, D. Couez, J. Deschamps, J. Ghysdael, D. Gregoire, R. Kettmann, M. Mammerickx, G. Marbaix, D. Portetelle. 1985. Bovine Leukemia Virus. A New Mode of Leukemogenesis. *Advances in Viral Oncology.* 5: 35-55.
- 13.-Burny, A., C. Bruck, Y. Cleuter, D. Couez, J. Deschamps, J. Ghysdael, D. Gregoire, R. Kettmann, M. Mammerickx, G. Marbaix, D. Portetelle, L. Willems. (1985). Bovine leukemia virus, a versatile agent with various pathogenic effects in various animal species. *Cancer Research (suppl.)* *Cancer Research* 45:4578s-4582s
- 14.-Burrige, M.J., Pühr, M.D., Hennemann, J.M. (1981). Prevalence of Bovine Leukemia Virus Infection in Florida. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179:704-707.
- 15.-Burrige, M.J., Thurmond, M.C., Miller, J.M., Schmerr, M.J.F., Van Deer Maaten, M.J. (1982). Duration of colostral antibodies to bovine leukemia virus by two serologic tests. *Am. J. Vet. Res.* 43(10): 1866-1867.
- 16.-Calafat, J., A.A. Resang. (1977). Morphogenesis of bovine leukemia virus. *Virology.* 80:42-53.

- 17.-Cerqueira, L.R., Modena, C.M., Moreira, E.C., Abreu, J.J. (1984). Evolucao Clínica de Leucose Enzoótica Bovina. *Arq.Bras.Med.Vet.Zoot.* 36: 47-57.
- 18.-Coulston J., H. Naif, R.Brandon, S.Kumar, S. Khan, R.C.W. Daniel, M.F. Lavin. (1990). Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukemia virus DNA: comparison with other isolates. *Journal of General Virology.* 71:1737-1746.
- 19.-Coulston, J., R.C.Daniel, M.F. Lavin. (1991). Integration of bovine leukemia virus at all stages of enzootic bovine leukosis. *Arch. Virol.* 119:13-23.
- 20.-Cowley, J.A., J.B. Molloy, C.K. Dimmock, P.J. Walker, A.G. Bruyeres, W.H. Hard. (1992). Infectivity of bovine leukemia virus infected cattle: An ELISA for detecting antigens expressed in in vitro cultured lymphocytes. *Vet. Microbiol.* 30:137-150.
- 21.-Derse, D., S.J. Caradonna, J.W. Casey. (1985). Bovine Leukemia Virus long terminal repeats: a cell type specific promoter. *Science* 227: 317-320.
- 22.-DiGiacomo, R.F. (1992). The epidemiology and control of bovine leukemia virus infection. *Veterinary Medicine.* 87:248-256.
- 23.-DiGiacomo, R.F. (1992). Horizontal transmission of the bovine leukemia virus. *Veterinary Medicine.* 87:263-271.
- 24.-DiGiacomo, R.F., Studer, E., Evermann, J.F., Evered, J. (1986). Embryo transfer and transmission of bovine leukosis virus in dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188: 827-828.
- 25.-Driscoll, D.M., C. Olson. (1977). Bovine leukemia virus-associated antigens in lymphocyte cultures. *Am. J. Vet. Res.* 38:1897-1898
- 26.-Espada,R., A.Flogio, F.Gurría, G.López, J.López, H.Meixueiro, J.Pérez, V.Yáñez, O.Hernández, D.Beymer, H.Riemann. (1986). Prevalencia de anticuerpos contra las enfermedades infecciosas más comunes del ganado bovino de Baja California. *Vet. Mex.* 17: 23-29.

- 27.-Esteban, E.N., R.M.Thorn, J.F. Ferrer. (1985). Characterization of the blood lymphocyte population in cattle infected with the bovine leukemia virus. *Cancer Research*. **45**: 3225-3230.
- 28.-Evermann,J.F.(1992) A Look at how bovine leukemia virus infection is diagnosed. *Comp. Cont.Med. Ed.* **14**:272-278.
- 29.- Everman,J., R. DiGiacomo, N. Hubber. (1980). Prevalence of bovine leukemia virus antibody in seven herds of Holstein-Friesian cattle. *JAVMA* **177**:549-550.
- 30.-Fenner, J.F., E.P.J.Gibbs, F.A. Murphy, R. Rott,M.J.Studdert, D.O. White. (1993). *Veterinary Virology*. Academic Press Inc. USA.
- 31.-Ferdinand, G.A.A; Langston, A.; Ruppner, R.; Drlica, S.; Thellen, G.H. and Behymer, D.E. (1987). Antibodies to bovine leukemia virus in a leukosis dairy herd and suggestions for control of the Infection. *Can. J. Comp. Med.* **43**: 173-179.
- 32.-Ferrer, J.F. (1979). Bovine leukosis: Natural transmission and principles of control. *J.A.V.M.A.* **175**: 1281-1286.
- 33.-Ferrer, J.F. (1982). Eradication of bovine leukemia virus infection form a high-prevalence herd, using radioimmunoassay for indentification of effected animals. *J.Am.Vet. Med. Assoc.* **180**:890-893.
- 34.-Ferrer, J.F., Bhatt, D.M., Abt, D.A., Marshak, R.R., Baliga, V.L.; (1975). Serological diagnosis of infection with putative bovine leukemia virus. *Cornell Vet.* **65**:527-542.
- 35.-Ferrer, J.F., C.E. Piper, D.A. Abt, R.R. Marshak. (1977). Diagnosis of bovine leukemia virus infection: Evaluation of serologic and hematologic tests by a direct infectivity detection assay. *Am. J. Vet. Res.* **38**:1977-1981.

- 36.-Ferrer, J.F., R.R. Marshak, D.A. Abt, S. Kenyon. (1978). Persistent Lymphocytosis in cattle: its cause, nature and relation to lymphosarcoma. *Ann. Rech. Vet.* 9:851-857.
- 37.-Ferrer, J.F., Marshak, R.R., Abt, D.A. Kenyon, S.J. (1979). Relationship between Lymphosarcoma and Persistent Lymphocytosis in Cattle: A Review. *J. Am. Vet. Assoc.*, 175:705-707.
- 38.-Florent, G. (1988). An ELISA for the diagnosis of bovine leukaemia virus infection. *Veterinary Record.* 123:570-571.
- 39.-Ghysdael, J., C. Bruck, R. Kettmann and A. Burny. (1984) Bovine Leukemia Virus. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 112:1-19.
- 40.-Ghysdael, J., R. Kettmann, A. Burny. (1978). Translation of bovine leukemia virus genome information in heterologous protein synthesizing systems programmed with virion RNA and in cell-lines persistently infected by BLV. *Ann. Rech. Vet.* 9:627-634.
- 41.-Graves, D.C., M. McQuade, K. Weibel. (1982). Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay with an early polykaryocytosis inhibition assay and the agar-gel immunodiffusion test for the detection of antibodies to bovine leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.* 43:960-966.
- 42.-Grover, Y.P., B. Guillemain. (1992). An immunoblotting procedure for detection of antibodies against bovine leukemia virus in cattle. *J. Vet. Med. B.* 39:48-52.
- 43.-Gupta, P., J.F. Ferrer. (1978). A critical comparison of the virus neutralization radioimmunoprecipitation and immunodiffusion tests for the serological diagnosis of BLV infection. *Ann. Rech. Vet.* 9:683-688.
- 44.-Henry, E. T., J. F. Levine, L. Coggins. (1987). Rectal transmission of bovine leukemia virus in cattle and sheep. *Am. J. Vet. Res.* 48:634-636.
- 45.-Hoof-Jørgensen, R. (1989). An international comparison of different laboratory tests for the diagnosis of bovine leucosis: Suggestions for

International standardization. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 22:293-297.

- 46.-House, C., J.A., Househand F.L. Glover, (1977). Antibodies to the glycoprotein antigen of bovine leukemia virus and the cattle population of five states. *Cornell Vet.* 67: 510-522.
- 47.- Huber, N.L., DiGiacomo, R.F.;Evermann, J.F.; Studer, E.(1981). Bovine leukemia virus infection in a large Hoistein herd:prospective Comparison of production and reproductive performance in antibody-negative and antibody- positive cows. *Am. J. Vet. Res.* 42: 1477-1481.
- 48.-Huber, N.L., DiGiacomo, R.F.;Evermann, J.F.; Studer, E.(1981). Bovine leukemia virus infection in a large Hoistein herd: Cohort analysis of the prevalence af antibody-positive cows. *Am.J.Vet. Res.* 42:1474-1476.
- 49.-Jacobs, R.M. (1983). Bovine Lymphoma. *In Comparative Pathobiology of Viral Diseases*. II:21-51.
- 50.-Jacobs, R. M., Z. Song, H. Poon, J.L. Heeney, J.A. Taylor, B. Jefferson, W. Vernau, V. E.O. Valli. (1992). Proviral detection and serology in bovine leukemia virus-exposed normal cattle with lymphoma. *Can. J. Vet. Res.* 56:339-348.
- 51.-Jaramillo, B. J. (1975) "El Linforsarcoma de Bovinos en la Cuenca Lechera del Valle de México". Tesis FMVZ/UNAM, México, D.F.
- 52.-Johnson,R.; J.B.Kaneene. (1991) Bovine Leukemia Virus. Part I. Descriptive Epidemiology,Clinical Manifestations, and Diagnostic Test. *Comp.Cont.Ed* 13:315-327.
- 53.-Johnson,R.; J.B.Kaneene. (1991) Bovine Leukemia Virus. Part II. Risk factor of transmision. *Comp.Cont.Ed.* 13:681-691.
- 54.-Johnson,R. C.D.Gibson, J.B. Kaneene. (1985).Bovine leukemia virus: A herd-based control strategy. *Preventive Veterinary Medicine*. 3:339-349.

- 55.-Kaaden, O. and J.R. Stephenson(1978). Report of the second session Detection of BLV infection: serological methods). *Ann. Res. Vét.* 9:604-605.
- 56.-Kaja, R.W.; Olson, C.; Rowe, R.F.; Stauffacher, R.H.; Strozinsky, L. L.; Hardie, A.R.; Bause, I. (1984). Establishment of bovine leukosis virus-free dairy herd. *J.Am.Vet. Med. Assoc.* 184: 184-185.
- 57.-Kelly, E.J., M. Jackson, G. Marsolais, J.D. Morrey, R.J. Callan. (1993). Early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of the polymerase chain reaction. *Am.J.Vet. Res.* 54:205-209.
- 58.-Klintevall,K., K. Näslund, G. Svedlund, L.Hajdu, N. Linde, B. Klingeborn. (1991). Evaluation of an indirect ELISA for the detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum. *Journal of Virological Methods.* 33:319-333.
- 59.-Langston, A.; Ferdinand, G.A.A.; Ruppanner, R.; Theilen, G.H.; Drlica, S.; Behymer, D. (1987). Comparison of production variables of bovine leukemia virus antibody-negative and antibody-positive cows in two California dairy herds. *Am. J. Vet. Res.* 39: 1093-1096.
- 60.-Larios, G.F., B. Madewell y B. L. Monroy. (1985). Complejo Leucosis Lymphosarcoma estudio epidemiológico en bovinos Pardo Suizo, *Reunión de Invest. Pec. en México.* pag. 85.
- 61.-Larson, V.L., D.K. Sorensen, R.K.Andersen, V.Perman. (1970). Epizootiologic studies on the natural transmission of bovine leukemia. *Am. J.Vet. Res.* 31:1533-1538.
- 62.-Lassauzet, M. G., M.C. Thurmond, W.O.Johnson, F. Stevens, J. P. Picanso. (1990). Effect of brucellosis vaccination and dehorning on transmission of bovine leukemia virus in heifers on a California dairy. *Can J.Vet. Res.* 54:184-189.

- 63.-Lassauzet, M. G., M.C. Thurmond, W.O.Johnson, F. Stevens, J. P. Picanso. (1991). Factor associated with transmission of bovine leukemia virus by contact in cows on a California dairy. *American Journal of Epidemiology*. 133:164-176.
- 64.-Lewin, H.A., D. Bernoco. (1986). Evidence for BoLA-linked resistance and susceptibility to subclinical progression of bovine leukemia virus infection. *Anim. Genet*. 17:197-207.
- 65.-Mammerickx, M.; Cormann, A.; Burny, A.; Dekeger, D. and Portetelle, D. (1978). Eradication of enzootic bovine Leukosis based on the detection of the diseases by the Gp immunodifusion test. *Ann. Rech. Vet*. 9(4) 885-894.
- 66.-Mamoun, R.Z., T. Astier, B. Guilleman, J.F. Duplan. 1983. Bovine Lymphosarcoma: Processing of bovine leukaemia virus-coded proteins. *J.Gen. Virol*. 64:2791-2795.
- 67.-Maniatis, T., E.F.Fritsch, y J.Sambrock. (1982). Molecular cloning : A Laboratory Manual. "Cold spring harbor laboratory Press", New York, USA.
- 68.-Marín, C; N.M. López; L. Alvarez; O. Lozano; W. Espinoza;H. Castaños, A. León. (1978). Epidemiology of Bovine Leukemia in Venezuela. *Ann Rec. Vet*. 9:743-746.
- 69.-Medina, C. M. (1988). Leucosis bovina. *Vet. Mex*. 19:151-159.
- 70.-Miller, J.M. (1988). Cultivation methods for production of bovine leukemia virus and soluble viral antigens. *Journal of Tissue Culture Methods*. 11:65- 7.
- 71.-Miller, J.M., L.D. Miller, C. Olson and K. G. Gillete. (1969). Virus like particules in Phytohemagglutinin stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J. Nat. Canc. Inst*. 43: 1297-1305.

- 72.-Miller, J.M., M.J. F. Schmerr, M.J. Van Der Maaten (1981). Comparison of Four Serologic Test for the detection of Antibodies to Bovine Leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.* 42:5-8.
- 73.-Miller, J.M., M.J. VanDer Maaten. (1976). Serologic detection of bovine leukemia virus infection. *Veterinary Microbiology.* 1:195-202.
- 74.-Miller, J.M., M.J. VanDer Maaten. (1977). Use of Glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Europ. J. Cancer* 13:1369-1375.
- 75.-Miller, J.M. and M.J. Van Der Maaten. (1978). A Complement- Fixation test for the Bovine Leukemia (C-type) Virus. *J. Natl. Canc. Inst.* 53:1699-1707.
- 76.-Miller, J.M. and M.J. Van Der Maaten. (1979). Infectivity test of secretions and excretions from cattle infected with bovine leukemia virus. *J. Natl. Cancer Inst.* 62: 425-428.
- 77.-Miller, J.M., M.J. Van Der Maaten. (1982). Bovine Leukosis- It's importance to the dairy industry in the United States. *J. Dairy Sci.* 65: 2194- 2203.
- 78.-Mirsky, M.L., Y. Da, H.A. Lewin. (1993). Detection of bovine leukemia virus proviral DNA in individual cells. *PCR Methods and Applications.* 2:333-340.
- 79.-Monke, D.R., R.F. Rhode, W.D. Hueston, R.J. Milburn. (1992). Estimation of the sensitivity and specificity of the agar gel immunodiffusion test for bovine leukemia virus: 1,296 cases (1982-1989). *J.A.V.M.A.* 200:2001-2004.
- 80.-Monroy, B. J. Trigo, F., A. S. Aluja, R.M. García. (1993). Estudio comparativo entre las pruebas de ELISA e inmunodifusion en el diagnóstico de la leucosis enzootica bovina. *Vet.Mex.* 24:21-25.

- 81.-Monroy, B. J. Trigo, F. Larios, G.F. Fajardo, M.R., Marquez. (1985) Estudio Seroepidemiológico de Leucosis Bovina en México. *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México*. Mex. D.F. p. 84.
- 82.-Murtaugh, M.P., G.F. Lin, D.L. Haggard, A.F.Weber, J.C. Meiske. (1991). Detection of bovine leukemia virus in cattle by the polymerase chain reaction. *J.Virol. Meth.* 33:73-85.
- 83.-Mussgay, M., O-R. Kaaden. (1978)..Progress in studies on the etiology and serologic diagnosis of enzootic bovine leukosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 79:43-72.
- 84.-Naif, H.M., R.C.W. Daniel, W.G. Cogle, M.F.Lavin. (1992). Early detection of bovine leukemia virus by using an enzyme-linked assay for polymerase chain reaction-amplified proviral DNA in experimentally infected cattle. *J. of Clin. Microbiol.* 30:675-679.
- 85.-Nguyen, V.K., R.F. Maes. (1993). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine leukemia virus in serum and milk. *Journal of Clinical Microbiology.* 31:979-981.
- 86.-Ohshima, K., Y. Aida, J.Kim, K. Okada, T. Chiba, K. Murakami, Y. Ikawa. (1991). Histopathology and distribution of cells harboring bovine leukemia virus (BLV) proviral sequences in ovine lymphosarcoma induced by BLV inoculation. *J. Vet. Med. Sci.* 53:191-199.
- 87.-Okada, K., Y. Hosokawa, Y. Aida, K. Ohshima. (1991). *In Situ* hibrydization for the demostration of bovine leukemia virus transcripts in lymphosarcoma cells using biotinylated probes. *J. Vet. Med. B.* 38:707-713.
- 88.-Olivares, E. (1990). Diseños experimentales. Fac. de Agronomía de la U.A.N.L.

- 89.-Olson,C, R.Kaja, R. Stauffacher, E. Zehener. (1978). Development of Bovine Leukosis virus infection in cattle. A preliminary study. *Ann. Rech. Vet.* 9:845- 849.
- 90.-Olson, C., J.M. Miller, L.D. Miller, K.G. Gillete (1970) C-type virus and lymphocytic Nuclear Projections in Bovine Lymphosarcoma. *JAVMA* 156: 1880-1887.
- 91.-Onuma, M., C.Olson, L.E. Baumgartener, L. D. Pearson. (1975). An ether-sensitive antigen associated with bovine leukemia infection. *J. Natl. Cancer. Inst.* 55:571.
- 92.-Poon, H., E. Jimenez, R.M. Jacobs, Z. Song, B. Jefferson. (1993). Detection of bovine leukemia virus RNA in serum using the polymerase chain reaction. *J. of Virol. Meth.* 41:101-112.
- 93.-Portetelle,D.; C.Bruc; A.Burny; D.Dekegel; M.Mammerick and J.Urbain (1978) Detection of Complement-Dependent Lytic Antibodies in sera from bovine Leukemia Virus Infected Animals. *Ann.Rech.Vet.* 9:667-674.
- 94.-Radke, K., T.J. Sigala, D. Grossman. (1992). Transcription of bovine leukemia virus in peripheral blood cells obtained during early infection *in vivo*. *Microbial. Pathogenesis* 12:319-331.
- 95.-Rebhun, W.C., (1982). Orbital Lymphosarcoma in Cattle., *J.Am. Vet. Med. Assoc.* 180:149-152.
- 96.-Reed, V.I. (1981) Enzootic Bovine Leukosis. *Can Vet. J.* 22: 95-102.
- 97.-Reinhardt, G. V. Hochstein-Mintzel, S. Riedemann, H. Leal y M. Niedda (1988). Estudio serológico de la Leucosis Enzoótica Bovina en un predio de la provincia de Valdivia y su relación a parámetros productivos y reproductivos. *J. Vet. Med. B.* 35: 178-185.

- 98.-Ressang,A.A.; A.L.J.Gielkens; S.Quak; N.Mastenbroek; C.Tuppert and A.De Castro. (1978) Enzyme Linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine Leukosis Virus. *Ann. Rech. Vet.* 9:663-666.
- 99.-Roberts, D.H., M.H. Lucas, G. Wibberley, D. Westcott. (1988). Response of cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus to bovine leukemia virus. *The Veterinary Record.* 122: 293-296.
- 100.-Sagata, N., T. Yasunaga, J. Tsuzuku-Kawamura, K. Ohishi, Y. Ogawa, Y. Ikawa.(1985). Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: Its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:677-681.
- 101.-Sagata,N., T. Yasunaga, Y. Ogawa, J. Tsuzuku-Kawamura, Y. Ikawa. (1984). Bovine Leukemia Virus: Uniquestructural features of its long terminal and its evolutionary relationship to human T-cell leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 4741-4745.
- 102.-Sagata, N., J. Tsuzuku-Kamakura, M. Nagayoshi-Aida, F. Shimizu, K. Imagawa, Y. Ikawa. (1985).Identification and some biochemical propieties of the major XBL gene product of bovine leukemia virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 82:7879-7883.
- 103.-Sherman, M.P., G. D.Ehrlich, J.F. Ferrer, J.J.Snisky, R. Zandomeni, N.L.Dock, B.J.Poiez. (1992). Amplification and analysis of specific DNA and RNA sequences of bovine leukemia virus from infected cows by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology.* 30:185-191.
- 104.-Sprecher, D.J. , K.D. Pelzer, P. Lessard. (1991). Possible effect of altered management practices on seroprevalence of bovine leukemia virus in heifers of a dairy herd with history of high prevalence of infection. *JAVMA.* 199: 584-588.

- 105.-Stott, M.L., M.C. Thurmond, S.J.Dunn, B.I. Osburn, J.L. Stott. (1991). Integrated bovine leukosis proviral DNA in T helper and T cytotoxic/suppressor lymphocytes. *Journal of General Virology*. 72:307-315.
- 106.-Straub,O.C., C.Olson. (1978). Report of the fourth session (Epidemiology of BLV). Third International Symposium on Bovine Leucosis. *Ann.Rech. Vét.* 9:605.
- 107.-Suzan, V.M., M. Onuma, R. E. Aguilar and Y. Murakawi (1983). Prevalence of Bovine Herpesvirus-1, Parainfluenza-3, Bovine Rotavirus, Bovine Viral Diarrhea, Bovine adenovirus-7, Bovine Leukemia Virus and Bluetongue virus antibodies in cattle in México. *Jpn. J. Vet. Res.* 31: 125- 132.
- 108.-Thurmond, M.C., and Burridge, M.J., (1982). Application of research to control of bovine leukemia virus-free cattle and semen. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181:1531-1534.
- 109.-Thurmond, M.C., C.B. Maden and R.L. Carter (1985), Cull rates of Dairy cattle with Antibodies to Bovine Leukemia Virus. *Canc. Res.* 45:1987-1989.
- 110.-Thurmond, M.C., G.R. Lapuz, T.B. Farver, G.C.Mondac. (1985). Retrospective study of four years of carcass condemnation rates for malignant lymphoma in California cows. *Am. J. Vet. Res.* 46(6): 1383-1391.
- 111.-Trejo, A. L., P. Zapata, A. Beltrán, y R. Avalos, (1990). Reactividad serológica contra el virus de la leucemia bovina (VLB) en bovinos de la región. *Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica*. Facultad de Medicina UANL., Monterrey, N.L., Mex.
- 112.-Uckert W., V. Wunderlich, J. Ghysdael, D.Portetelle, A.Burny. (1984). Bovine leukemia virus (BLV)- a structural model based on chemical crosslinking studies. *Virology*. 133:386-392.

- 113.-Van Der Maaten, M.J. and Miller, J.W. (1979). Appraisal of control Measures for bovine leukosis. *J.Am. Vet. Med. Assoc.* **175**:1287-1290.
- 114.-Van Der Maaten, M.J.; Miller, J.M., Scherrer, M.J.F., (1981). Effect of Colostral Antibody on Bovine Leukemia Virus infection of Neonatal Calves; *Am. Vet. Res.* **42**:1498-1500.
- 115.-Walker, P.J., J.B. Molloy, B.J.Rodwell. (1987). Protein immunoblot test for detection of bovine leukemia virus p24 antibody in cattle and experimentally infected sheep. *J. Virol. Meth.* **15**:201-211.
- 116.-Weber, A.F. et. al. (1987) In vitro viral expression as a criterion for development of control procedures for enzootic bovine leukosis. *Am. J. Vet. Res.* **48**:889-903.
- 117.-Wu, M., R.D.Shanks, H.A.Lewin. (1989). Milk fat production in dairy cattle influenced by advanced subclinical bovine leukemia virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 993-996.
- 118.-Yoshikawa, T., H. Yoshikawa, H. Koyawa and S. Tsubaki (1982). Preliminary attempts to Eradicate infection with Bovine leukemia virus from a stock farm in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.* **44**:831-834.
- 119.-Yoshinaka, Y., I.Katoh, T.D.Copeland, G.W. Smythers and S.Oroszlan. (1986). Bovine Leukemia Virus Protease: Purification, Chemical Analysis, and In Vitro Processing of gag Precursor Polyproteins. *Journal of Virology.* **57**:826-832.
- 120.- Zanoni, R., A. Krieg, E. Peterhans. (1989). Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus by protein G enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *J. of Clin. Microbiol.* **27**: 580-582.
- 121.-Zapata, B.P.; R. Avalos; M.A. Lara; R. Tamez y L. Trejo. (1992) Prevalence of VLB in neighboring areas to Monterrey, Saltillo and Torreón. *Reunión Internacional de Microbiología.* Facultad de Medicina, UANL. Monterrey, N.L

APENDICE

Constitucion del medio FLK-BLV (Mantenimiento)

Medio Dulbeccos modificado	100 ml. 2x
Suero fetal bovino	16 ml
Penicilina-Estreptomicina (1%)	0.2 ml.
Bicarbonato de Sodio	15 ml.
aforar con H ₂ O tridestilada	200 ml.

Medio para la Producción de Antígeno soluble

Dulbeccos modificado	50 ml 2x
Suero Fetal Bovino	5 ml
Penicilina-Estreptomicina	0.1 ml.
Bicarbonato de Sodio	10 ml.
Aforar con H ₂ O tridestilada	100 ml.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

Buffer's

PBS ph 7.4 0.05M

soluto	cantidad 10lts	cantidad 1 lt
Na ₂ HPO ₄	16.7 gr	1.67 gr
Na H ₂ PO ₄	5.7 gr	0.57 gr
Na Cl	85.0 gr	8.50 gr
Na N ₃	100 mg	10 mg

Disolver en agua destilada aforar a 10 lts, checar el ph y almacenar a temperatura de cuarto.

TRIS - HCl

12.1 gr tris (hidroximetilamina)

1 M HCl

Disolver el tris en 800 ml y ajustar el ph a 7.4 usando 1 M de HCl aforar a 1 lt y almacenar a 4 grados centigrados.

BUFFER DE DIETANOLAMINA 0.1 M, ph 9.8

10.1 mg MgCl₂

0.5 H₂O

Disolver en 60ml de agua destilada mas 19.4 ml de dietanolamina, mezclar muy bien y ajustar el ph a 9.8 con HCl concentrado y aforar a 100 ml agregar 20 mg de NaN₃ y almacenar en frasco oscuro a 4 grados centigrados.

Buffer's empleados en el Dot blot

A).- Buffer de bloqueo (almacenar entre 0-4°C)

50mM Trizma-HCl

1mM EDTA

0.3% Tween20

25% leche descremada

pH 7.5

B).- Buffer 1

100mM Trizma-HCl

1.0 M NaCl

2mM MgCl₂

0.05% Triton X-100

pH 7.5

C).- Buffer 2

100 mM Trizma-HCl

1.0 NaCl

5mM MgCl₂

pH 9.5

D).- Buffer 3

100 mM Trizma-HCl

100mM NaCl

5mM MgCl₂

pH 9.5

Componentes incluidos en el juego comercial “SulfoPROBE”

- 1.- Solución de Modificación A
- 2.- Solución de Modificación B
- 3.- Solución de DNA de esperma de salmón (0.5 mg/ml)
- 4.- Dna de Testículo de salmón (0.3 mg/ml)
- 5.- Anticuerpos monoclonales contra DNA modificado (Anti-DNA)
- 6.- Anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina
- 7.- Azul de Tetrazolio (NBT)
- 8.- 5-Bromo-4-cloro-3-indol fosfato (BCIP) en dimetilformamida (50 mg/ml).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Procedimiento del juego comercial “SulfoPROBE”

I.- Reacción de modificación

- a).- Diluir el DNA (plásmido) a modificar en agua destilada (0.5mg/ml).
- b).- Desnaturalizar el DNA en calentandolo por 10 minutos.
- c).- Enfriar en hielo
- d).- Agregar 50µl de la solución de modificación A a 0.1ml del DNA desnaturalizado, agitar y despues agregar 12.5µl de la solución de modificación B, agitar brevemente.
- e).- Se incuba ésta mezcla durante toda la noche a temperatura ambiente.

II.- Control de la reacción de modificación

- a).- Se deposita 100µl de la solución del DNA de esperma de salmón.
- b).- Se efectúa la reacción de modificación como en la sección I.

III.- Se emplea el DNA del testículo de salmon como agente bloqueador en la membrana durante la prehibridación. La actividad óptima en la reacción de hibridación se obtiene si el DNA modificado (etapa I) se utiliza a una concentración de 1.0-10.0 µg/ml.

IV.- Visualización inmunológica de la hibridación (Híbrido).

- a).- Se transfiere la membrana a una bolsa de plástico. Se agregan 50µl del Buffer de bloqueo por cada cm², se sella la bolsa y se incuba durante 1 hora a temperatura de cuarto agitándose durante este tiempo. Mientras tanto el anticuerpo anti-DNA se diluye 1:300 en Buffer de bloqueo. (se prepara un volumen suficiente para 50 µl por cm²).
- b).- Se abre la bolsa, se desacarta el buffer de bloqueo y se agrega el anticuerpo anti-DNA recién diluido. se vuelve a sellar la bolsa y se incuba durante una hora a temperatura de cuarto con agitación constante.

- c).- Se lava la membrana 3 veces en Buffer 1 (15 minutos por lavado usando 3 ml/cm² por cada lavado).
- d).- Se coloca la membrana en una nueva bolsa de plástico. El anticuerpo anti-IgG conjugado con fosfatasa alcalina se diluye 1:300 en Buffer de bloqueo (50µl por cm² de membrana). se agrega el conjugado a la bolsa y se incuba 1 hora a temperatura ambiente con agitación.
- c).- Después de la última incubación (etapa d) se lava 3 veces con el Buffer 1 al menos 20 minutos por lavado, después 2 veces con el Buffer 2.
- d).- Se deposita la membrana (lado no reactivo) en papel filtro durante 2 minutos.

e).- Mientras tanto, se prepara la solución de sustrato cromogénica a una concentración final de 0.3 mg/ml de NBT y 0.2 mg/ml BCIP en Buffer 3. (La solución cromogénica se debe de preparar inmediatamente antes de uso o almacenarse en pequeñas alicuotas a -20°C, estable por 1-2 semanas).

d).- Se transfiere la membrana lavada a una nueva bolsa de plástico. Se agregan 5 ml de la solución del sustrato recién preparada. Se sella la bolsa y se incuba a temperatura de cuarto durante 10-30 minutos en la oscuridad (si el color no es evidente se incuba una hora mas o hasta que se desarrolle el color. Se detiene la reacción sumergiendo la membrana en agua.

MEDIO LURIA-BERTONI (L-B)

Bacto-Tripton 10 gr.

Extracto de Levadura 5 gr.

Cloruro de Sodio 10 gr.

Aforara a 1000 ml

Ajustar pH a 7.5 con NaOH

Soluciones para la prueba de Fijación de Complemento

Diluyente Solución Salina (0.85%)

Cloruro de Sodio 0.85 gr.

Sol'n stock de iones de Calcio..... 0.1 ml.

Sol'n de Azida de sodio 0.025 ml.

Agua bidestilada 100 ml.

Solución stock de iones de Calcio

1 M Cloruro de Magnesio (9.5 gr. Cloruro de Magnesio anhidro)

0.3 M Cloruro de Calcio (3.7 gr. Cloruro de Calcio Anhidro)

Aforara a 100 ml. de agua bidestilada.

Colecta y almacenamiento de eritrocitos de oveja

Los eritrocitos de oveja usados como indicador de hemolisis se obtuvieron a partir de la vena yugular de un ovino sulfok de 1 año de edad; previa depilación del área con una aguja y jeringa estéril la sangre se extrajo y se mezcló con Solución de Alsever contenida en un frasco del cual se fraccionaron en alicuotas de 5 ml. en condiciones de esterilidad, se almacenaron en refrigeración y se emplearon hasta después de 5 días de colectados.

Solución de Alsever's

Glucosa 18.66 g

Cloruro de Sodio 4.18 g

Citrato de Sodio 8.00 g

Acido Citrico 0.55 g

Agua bidestilada aforar a ... 1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 110 Libras de presión a durante 10 minutos.

Lavado de los eritrocitos (realizarse el mismo día de uso)

1.- 10 ml de sangre almacenada en alsever's se mezclan con 40 ml del diluyente estos se _ a 1500 rpm. durante 10 m.

2.- El sedimento se mantiene y se remueve la capa de leucocitos junto con el sobrenadante.

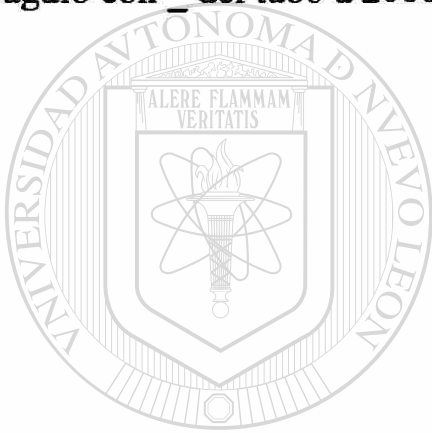
3.- se le agregan de nuevo 40 ml. de diluyente y se repiten los pasos anteriores.

4.- despues se resuspenden en 10 ml de diluyente y se depositan en un tubo cónico graduado para 15 ml. estos se _ a 1500g x 10m se anota la cantidad de sedimento y se remueve cuidadosamente el sobrenadante.

Preparación de Complemento

Se alimentaron 4 cobayos adultos _ con alfalfa verde durante 1 semana y 12 horas antes de sangrar se les quito la alimentación y se les mantuvo con agua.

La sangre se obtuvo directo del corazón y se depositaron en tubos limpios, el suero se obtuvo inmediatamente (no más de 1 hora) despues de formación del coagulo con _ del tubo a 2000 rpm



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 1.-Concordancia entre las técnicas serológicas para detectar anticuerpos anti-VLB en un hato con elevada (IDAG) seroprevalencia

Numero	ELISA/DO	Inmunoblot	IDAG
1	+0.46	+	+
2	+0.38	+	+
3	+0.67	+	+
4	+0.35	+	+
5	+0.49	+	+
6	+0.33	+	+
7	-0.10	-	-
8	-0.08	-	-
9	+0.37	+	+
10	+0.42	+	+
11	-0.17	+	-
12	-0.17	+	-
13	+0.33	+	+
14	+0.49	+	+
15	-0.08	-	-
16	-0.08	-	-
17	+0.22	-	-
18	+0.43	+	+
19	-0.09	-	-
20	-0.08	-	-
21	+0.29	+	-
22	+0.30	+	-
23	+0.26	+	-
24	+0.38	+	+
25	-0.15	-	-
26	+0.28	+	-
27	+0.33	+	-
28	+0.38	+	+
29	+0.43	+	+
30	+0.45	+	+
31	+0.47	+	+
32	+0.43	+	+
33	+0.76	+	+
34	+0.47	+	+
35	+0.43	+	+
36	+0.28	+	-
37	+0.36	+	+
38	-0.17	+	-
39	-0.10	-	-
40	+0.38	+	+

Tabla 2.-Concordancia entre las técnicas serológicas para detectar anticuerpos anti-VLB en un hato con baja (IDAG) seroprevalencia.

Numero	ELISA/DO	Inmunoblot	IDAG
1	-0.10	-	-
2	+0.30	+	+
3	+0.38	+	+
4	-0.12	-	-
5	-0.10	-	-
6	-0.08	-	-
7	-0.02	-	-
8	-0.08	-	-
9	-0.08	-	-
10	+0.22	-	-
11	-0.15	-	-
12	-0.12	-	-
13	-0.10	-	-
14	-0.10	-	-
15	+0.30	+	-
16	+0.24	-	-
17	-0.17	-	-
18	-0.10	-	-
19	-0.08	-	-
20	+0.38	+	-
21	-0.10	-	-
22	-0.12	-	-
23	-0.16	-	-
24	-0.18	-	-
25	-0.10	-	-
26	-0.10	-	-
27	-0.12	-	-
28	-0.10	-	-
29	-0.18	+	-
30	-0.16	-	-
31	+0.48	+	+
32	+0.44	+	+
33	-0.12	-	-

